

RO/KR 24 09 2003
10/528644
Rec'd PCT/PTO 18 MAR 2005

REC'D 15-OCT 2003
WIPO PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0068496
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 11월 06일
Date of Application NOV 06, 2002

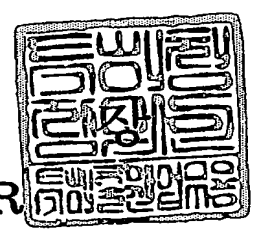
출원인 : 주식회사 제넥신 외 4명
Applicant(s) Genexine Inc., et al.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 09 월 24 일

특 허 청
COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】

특허출원서

【권리구분】

특허

【수신처】

특허청장

【제출일자】

2002.11.06

【발명의 명칭】

플라스미드 DNA 및 재조합 아데노 바이러스를 이용한 C형
간염 바이러스에 대한 방어면역력을 증진시키는 백신

【발명의 영문명칭】

A vaccine enhancing the protective immunity to Hepatitis C
virus using plasmid DNA and recombinant adenovirus

【출원인】

【명칭】

주식회사 제넥신

【출원인코드】

1-1999-058655-9

【출원인】

【명칭】

학교법인 포항공과대학교

【출원인코드】

2-1999-900096-8

【출원인】

【명칭】

동아제약 주식회사

【출원인코드】

1-1998-000906-1

【출원인】

【명칭】

주식회사 대웅제약

【출원인코드】

1-1998-000709-3

【출원인】

【명칭】

주식회사 포스코

【출원인코드】

1-1998-004076-5

【대리인】

【성명】

이원희

【대리인코드】

9-1998-000385-9

【포괄위임등록번호】

1999-065320-8

【포괄위임등록번호】

1999-066370-1

【포괄위임등록번호】

1999-012838-7

【포괄위임등록번호】

1999-024049-7

【포괄위임등록번호】

2002-074784-1

【발명자】

【성명의 국문표기】

【성명의 영문표기】

【주민등록번호】

성영철

SUNG, Young Chul

560507-1010410

790-310

경상북도 포항시 남구 대잠동 현대이동타운 101동 601호
KR

【성명의 국문표기】

【성명의 영문표기】

【주민등록번호】

【우편번호】

【주소】

【국적】

윤진원

YOUN, Jin-Won

650906-1144318

403-822

인천광역시 부평구 부평3동 276-24 5/1

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

【성명의 영문표기】

【주민등록번호】

【우편번호】

【주소】

【국적】

양세환

YANG, Se-Hwan

700501-1042329

790-390

경상북도 포항시 남구 지곡동 승리아파트 5동 602호

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

【성명의 영문표기】

【주민등록번호】

【우편번호】

【주소】

【국적】

박수형

PARK, Su-Hyung

780430-1080411

134-786

서울특별시 강동구 명일2동 44, 신동아아파트 6-1101

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

【성명의 영문표기】

【주민등록번호】

이창근

LEE, Chang Geun

680517-1670311

【우편번호】	701-770
【주소】	대구광역시 동구 신천동 645-1, 우방푸른타운 106-1603
【국적】	KR
【우선권주장】	
【출원국명】	KR
【출원종류】	특허
【출원번호】	10-2002-0058712
【출원일자】	2002.09.27
【증명서류】	미첨부
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터
【수탁번호】	KCCM-10415
【수탁일자】	2002.08.29
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터
【수탁번호】	KCCM-10416
【수탁일자】	2002.08.29
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터
【수탁번호】	KCCM-10417
【수탁일자】	2002.08.29
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터
【수탁번호】	KCCM-10418
【수탁일자】	2002.08.29
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터
【수탁번호】	KCCM-10419
【수탁일자】	2002.08.29
【미생물기탁】	
【기탁기관명】	한국미생물보존센터
【수탁번호】	KCCM-10420
【수탁일자】	2002.08.29

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 54

【서열목록의 전자파일】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
이원희 (인)

【수수료】

【기본출원료】 20 면 29,000 원

【가산출원료】 108 면 108,000 원

【우선권주장료】 1 건 26,000 원

【심사청구료】 0 항 0 원

【합계】 163,000 원

【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_6통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 C형 간염 바이러스(HCV)에 대한 DNA 백신, 재조합 아데노 바이러스 백신 및 이를 이용한 HCV에 대한 면역력을 증진시키는 방법에 관한 것으로서, 면역 억제 기능을 갖고 있다고 보고된 코아(Core)의 아미노 말단부 40개 아미노산을 제거하고 이를 E1, E2와 동시에 발현하도록 하는 Δ 코아-E1-E2 DNA 백신, 비구조 단백질 중 NS3과 NS4를 발현하는 DNA 백신, 나머지 비구조 단백질인 NS5를 발현하는 DNA 백신 및 위 DNA 백신들과 동일한 부위를 발현하는 재조합 아데노 바이러스 백신, 그리고, DNA 백신으로 프라이밍을 하고 재조합 아데노 바이러스 백신으로 부스팅함으로써 HCV에 대한 면역력을 증진시키는 백신 투여 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 백신의 조합은 소동물 모델 뿐만 아니라, C형 간염 바이러스의 유일한 실험동물 모델인 침팬지에서도 효과적인 세포성 면역 반응을 유도하므로 C형 간염 바이러스에 대한 면역력을 증진시키는 방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

【대표도】

도 3

【명세서】

【발명의 명칭】

플라스미드 DNA 및 재조합 아데노 바이러스를 이용한 C형 간염 바이러스에 대한 방어면역력을 증진시키는 백신{A vaccine enhancing the protective immunity to Hepatitis C virus using plasmid DNA and recombinant adenovirus}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 소동물 실험에 사용된 플라스미드에 대한 모식도이다 (괄호안의 숫자는 C형 간염 바이러스의 항원의 아미노산 범위를 나타내며, 이는 도 2 내지 도 4에서 동일하다).

gDs : 허피스 심플렉스 바이러스(HSV) 당단백질 D(glycoprotein D; gD)의 신호서열 (signal sequence)

도 2는 본 발명의 검증을 위해 침팬지 실험에 사용된 플라스미드 HC102에 대한 모식도이다.

도 3은 본 발명의 검증을 위해 침팬지 실험에 사용된 플라스미드 HC103에 대한 모식도이다.

도 4는 본 발명에 사용된 재조합 아데노 바이러스(recombinant adenovirus, rAd)에 대한 모식도이다.

도 5는 진핵 세포인 COS-7 세포주에서 본 발명의 소동물 실험에 사용된 플라스미드를 통해 실제적으로 HCV의 항원 단백질이 발현되는지를, HCV E2에 대한 단일 항체를 사용하여 웨스

턴 블롯을 통해 확인한 전기 영동 사진으로서, 모든 플라스미드를 한눈에 볼 수 있는 사진(A), E2의 막관통 도메인이 제거됨으로써 발생하는 단백질 분자량의 차이를 보여주는 사진(B)이다.

도 6은 진핵 세포인 COS-7 세포주에서 본 발명의 소동물 실험에 사용된 플라스미드중 코아(Core)의 발현 여부와 함께 N 말단 40 아미노산의 제거여부를 확인하기 위해, 코아(Core)에 대한 다중 항체로 웨스턴 블롯을 실시한 전기 영동 사진이다.

도 7은 진핵 세포인 COS-7 세포주에서 본 발명의 침팬지 실험에 사용된 플라스미드의 발현여부를 확인한 전기 영동 사진으로서, 구조 단백질 중 E2의 발현(A), 비구조 단백질 NS3과 NS4B의 발현(B), 그리고 NS5의 발현(C)을 확인한 사진이다.

도 8은 진핵 세포인 293A 세포주에서 본 발명에 사용된 아데노 바이러스의 발현여부를 확인한 전기 영동 사진으로서, E2의 발현(A), 비구조 단백질 NS34의 발현(B), 그리고 NS5의 발현(C)을 확인한 사진이다.

도 9는 HCV 전체 유전자를 어떻게 나누어서 백신을 만드는데 따라, 유도되는 세포성 면역 반응의 강도가 달라짐을 생쥐 모델에서 보여주는 결과로서, 1회 면역화 한지 5주 후에 세포성 면역 반응을 조사한 그래프이다.

도 10은 HCV 전체 유전자를 어떻게 나누어서 백신을 만드는데 따라, 유도되는 세포성 면역 반응의 강도가 달라짐을 생쥐 모델에서 보여주는 결과로서, 2회 면역화 한지 3.4주 후의 세포성 면역 반응을 조사한 그래프이다.

도 11은 HCV 코아(Core)의 아미노 말단부 제거가 세포성 면역 반응 유도를 증가시킨다는 사실을 생쥐 모델에서 보여주는 결과로서, 1회 면역화 한지 5주 후의 세포성 면역 반응을 조사한 그래프이다.

도 12는 HCV E2의 막관통 도메인을 제거하지 않은 DNA가 제거한 DNA에 비해 세포성 면역 반응을 잘 유도한다는 사실을 생쥐 모델에서 보여주는 결과로서, 1회 면역화 한지 5주 후 면역화 한지 3.4주 후의 세포성 면역 반응을 조사한 그래프이다.

생쥐 모델에서 CD4+ T 세포를 MACS(magnetic associated cell sorting)에 의하여 HCV E2 혹은 코아 단백질에 반응하여 IFN- γ 혹은 IL-4를 분비하는 CD4+ T 세포 결과를 보여주는 그래프이다.

내 용 : 생리식염수만이 주입된 군

G1 : pGX10 gDs Δ ST + pGX10-mIL-12 변형체 주입 후, pGX10 gDs Δ ST + pGX10-mIL-12 변

형체를 주입한 군

G2 : pGX10 gDs Δ ST + pGX10-mIL-12 변형체 주입 후, rAd gDs Δ ST를 주입한 군

G3 : rAd gDs Δ ST 주입 후, rAd gDs Δ ST를 주입한 군

G4 : rAd gDs Δ ST 주입 후, pGX10 gDs Δ ST + pGX10-mIL-12 변형체를 주입한 군

도 14는 HCV E2 항원을 발현하는 CT26-hGHE2t 세포주를 이용하여 살상 세포 반응을 조사한 결과를 보여주는 그래프이다.

— : 대조군, ● : G1, ◆ : G2, ■ : G3, ▲ : G4

도 15는 본 발명의 백신의 효력을 검증하기 위해 실시된 침팬지 실험의 면역화 방법(vaccination regimen)을 시간에 따라 도식화한 것이다.

도 16은 침팬지 모델에서, 재조합 아데노 바이러스로 부스팅한 후 2주 시점에서 세포성 면역 반응 중 IFN- γ ELISPOT 분석을 수행한 결과를 보여주는 그래프이다.

1 0068496

도 17은 침팬지 모델에서, 재조합 아데노 바이러스로 부스팅한 후 2주 시점에서 세포성 면역 반응 중 CD4+ Th 세포에 의해 분비되는 IFN- γ 의 양을 측정한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 18은 침팬지 모델에서, 재조합 아데노 바이러스로 부스팅한 후 2주 시점에서 세포성 면역 반응 중 CD4+ Th 세포의 증식 정도를 측정한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 19는 침팬지 모델에서, 상기 백신으로 면역화 한 후 12주 시점에서 100 CID₅₀에 해당하는 감염성 이종 HCV-bk로 접종한 후, 0, 2, 4주 시점에서의 증식된 바이러스의 양을 측정한 결과를 보여주는 그래프이다.

도 20은 세포성 면역 반응 조사를 위해 사용된 HCV 펩타이드 풀의 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<28> 본 발명은 C형 간염 바이러스에 대한 DNA 백신, 재조합 아데노 바이러스 백신 및 이를 이용한 C형 간염 바이러스에 대한 면역력을 증진시키는 백신 투여 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 항원 조작(antigen engineering)을 통해 최적의 세포성 면역 반응을 유도할 수 있도록 제조된 DNA 백신, 재조합 아데노 바이러스 백신 및 이들 백신의 투여 순서를 조절함으로써 HCV에 대한 면역력을 증진시키는 백신 투여 방법에 관한 것이다.

29> HCV (hepatitis C virus)는 1989년 미국의 카이론사(Chiron company)에 의해 비-A, 비-B (NANB)형 간염의 주요 병원체로서 최초로 발견되었다(Choo, *Science*, 1989, 244:359-362). 이후 HCV 진단 시약의 개발로 HCV 감염 실태를 조사한 결과, 전세계적으로 약 1억 7천만명 정도가 HCV에 감염되어 있으며 국내에서도 전체 인구의 1.5% 가량이 HCV 바이러스 보균자인 것으로 알려졌다. 일단 HCV에 감염되면 약 85%에 달하는 높은 비율로 만성감염으로 전이될 뿐 아니라, 만성감염을 거친 후에는 간경변 및 간암으로 진행하게 되는 등(Bisceglie, *Hepatology*, 1997, 26:345) 심각한 질병으로 인식되어 왔으나, 아직까지 HCV에 대한 효과적인 치료제 및 예방백신이 개발되어 있지 않은 실정이다.

<30> 보고된 임상연구에 의하면, HCV에 감염된 이후에 회복되는 환자와 만성감염으로 진행된 환자들의 면역상태를 조사해 보았을 때, 회복되는 환자에게는 HCV에 특이적인 세포성 면역반응이 관찰되는 반면에 만성감염으로 이행된 환자에게는 이러한 면역반응이 관찰되지 않았으며(Rehermann, *J. Virol.*, 1996, 70:7092; Lechner, *J. Immunol.*, 2000, 30:2479), 세포성 면역반응 중에서도 CD4+ Th1 면역반응이 특히 HCV에 의한 감염에 대한 방어 및 회복에 밀접하게 관련되어 있다고 알려져 있다(Rosen, *Hepatology*, 2002, 35:190; Sarik, *Immunol. lett.*, 2000, 74:117; Diepolder, *J. Mol. Med.*, 1996, 74:538). 또한, 페이프(Pape) 그룹이 조사한 바에 의하면 급성 HCV 감염 이후의 질병 경과는 1) 바이러스가 제거된 그룹에서는 강한 CD4+ Th1 면역 반응을 보이고, 2) 만성 감염이 진행된 환자들에서는 CD4+ T 세포 면역 반응이 나타나지 않으며, 3) 초기에 바이러스를 제어하고 있을 때는 CD4+ T 세포 면역 반응이 나타나지만, 이러한 면역 반응이 감소하면서 HCV 바이러스의 재발이 나타나는 3가지 유형으로 분류될 수 있다(Gerlach, *Gastroenterology*, 1999, 117:933). 이러한 연구결과는 HCV 바이러스의 제어 및

제거에는 CD4+ Th1 면역반응이 매우 중요하다는 것을 명확하게 나타내는 것이다. HCV의 감염 및 복제가 가능한 유일한 실험동물 모델인 침팬지를 이용한 연구에서도 임상에서 관찰된 것과 동일하게 항체 면역이 아닌 세포성 면역이 HCV 감염 이후의 회복에 중요한 역할을 한다는 것이 보고되었다(Cooper, *Immunity*, 1999, 10:439). 이러한 연구결과는 HCV의 예방 및 치료를 위해서는 강력하고 다중 에피토프(multi-epitope) 특이적인 Th1 면역력이 필요하다는 것을 시사하고 있으며, 이에 따라 현재 HCV에 대한 예방 및 치료 백신의 개발은 이러한 Th1 세포성 면역 반응을 최적화시킬 수 있는 전략에 초점을 맞추어 진행되고 있다.

<31> HCV 예방 백신으로 처음 시도된 것은 HCV의 외피 단백질인 엔벨롭(envelope) 1, 2 (E1, E2)를 이용한 하부단위체(subunit) 단백질 백신이다. HCV E1E2는 바이러스의 표면 단백질로서 감염시 숙주세포의 수용체와 결합하는 단백질이므로, 이들 단백질에 대한 중화 항체가 숙주에 존재하면 HCV가 감염하는 것을 억제할 수 있다. 침팬지에서 E1E2 하부 단위체 백신을 시도해 본 결과, 10 CID₅₀의 감염양(infection dose)으로 동종 접종(homologous challenge)을 시도했을 때에는 7 마리 중 5마리가 HCV의 감염 자체에 대한 차단 효과를 보였고, 나머지 2마리의 경우 감염은 허용하였으나 만성 감염을 차단한다는 성공적인 결과를 보여 주었다(Choo,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994, 91:1294). 이 보고가 HCV의 예방 백신에 대한 첫 번째 보고로서, 그 효력을 침팬지 모델에서 입증했다는 의의를 갖고 있으나, 여러 가지 한계점 또한 내포하고 있다. 첫째, 접종에 사용한 HCV의 양이 적을 뿐 아니라 (10 CID₅₀), 그 시점이 항체 반응이 가장 왕성한 시기에 이루어졌다는 점이다. 일반적으로 백신은 언제 감염될지 모르는 상황에서 항원에 대한 기억 반응(memory response)으로 감염원을 차단해야 하는데, 위 보고에서의 항체 반응은 접종(challenge) 시기를 지나면서 급격히 감소하고 있다. 즉, 항체 반응이 감소한 시점에서 감염원이 침입할 때도 동일한 효과를 나타낼 수 있을지는 미지수인 것이다. 둘째, 동종 접종에 대한 예방 효과는 보여 주었으나 이종 접종(heterologous challenge)에 대해서는 그 효과를 보여 주지 못하고 있다. HCV는 현재까지 최소한 6종의 주 유전자형 뿐 아니라 그 하부 계열에 수 많은 서브타입(subtype)이 존재한다는 사실(Bukh, 1995, 15: 41-63)을 고려할 때, 최소한 같은 유전자형 내의 이종 접종에 대한 예방 효과가 없다면 백신으로서의 실효성을 갖기가 어렵다는 점이다. 마지막으로, 방어 면역의 수단을 항체 반응에 의존하고 있다는 점이다. 최근 들어, HCV의 방어에 필요한 면역 반응으로 세포성 면역 반응의 중요성이 부각되는 보고 뿐 아니라 항체 반응의 무위성에 대해서도 많은 보고가 잇따르고 있다(Cooper, 1999,

Immunity, 10: 439; Esumi, 2002, *Vaccine*, 20:3095-3103). 따라서, 항체 반응에만 의존하는 단백질 백신으로는 효과적인 방어 면역을 유도하는데 부정적인 견해가 자리잡고 있다. 이러한 추세로 인해, 최근 들어 DNA 백신으로 세포성 면역 반응의 유도에 초점을 맞춘 시도가 있었는데, HCV의 표면 단백질인 E2를 발현하는 DNA를 사용하여 면역화 한 후 100 CID₅₀의 동종 접촉에 대한 방어 효과를 주장한 보고가 그것이다(Forns X.,

Hepatology, 2000, 32(3): 618-25). 이 보고는 세포성 면역 반응을 유도하는 DNA를 사용하여 침팬지에 예방 백신의 효과를 조사한 첫번째 보고라는 점에서 의의가 있으나, 또한 다음과 같은 점을 지적할 수 있다. 첫째, 접종(challenge) 시점이 면역 반응의 최고에 다다른 것이고, 둘째, 접종(challenge)에 사용한 감염성 HCV가 단일한 종류(monoclonal antigen inoculum)라는 점이다. HCV나 HIV (human immunodeficiency virus)와 같이 RNA 중합효소 (RNA dependent RNA polymerase)를 자기 복제에 사용하는 RNA 바이러스들은, 복제시의 높은 오차율로 인해 수 많은 변이체(quasispecies)가 생성되는데, 이러한 변이체의 다양성은 만성 감염으로의 진행에 매우 중요한 역할을 한다고 보고(Farci P, 2000, Science, 288:339)되었다. 최근에 HCV RNA를 간으로 직접 주사했을 때, 세포내로 유입되어 발현됨으로써 완벽한 바이러스까지 만들수 있다는 사실이 보고 되었는데 (Kolykhalov, 1997, Science, 277: 570-4), 앞선 보고에서 사용한 감염성 바이러스는 HCV RNA를 침팬지에 주사한 후 피에서 수확한 것으로서, 단일 클론으로부터 생성되었다는 점으로 인해 실제로 존재하는 다양한 폭의 변이체를 제공하지는 못한다. 따라서, 위에서 얻은 예방 효과가 다양한 변이체를 포함하는 실질적인 감염성 HCV로 시도 했을 때에도 동일하게 나타날 수 있을지는 미지수다. 마지막으로, 관찰된 면역 반응이나 바이러스의 감염 역학 (course of infection)을 관찰해 볼 때, 위에서 얻은 결과가 진정으로 백신에 의해 유도된 면역 반응에 의한 것인지 불분명하다. 즉, 자연적인 치료율 (약 50 %)과 구분해 줄 수 있는 면역학적 단서가 부족함으로써, 진정한 예방 효과를 보이고 있는지를 결론지을 수 없다는 점이다.

<32> DNA 백신은 세포성 면역 반응을 유도할 수 있다는 점에서 단백질 백신을 능가한다. DNA 백신은 항원이 숙주 내에서 발현되기 때문에, 자연적인 구조형태(native conformation)와 가장

유사한 형태로 체액성(humoral) 면역 반응을 유도할 수 있을 뿐 아니라, 세포성(cellular) 면역 반응 중에서도 단백질 백신이 유도할 수 없는 CD8+ T 세포 반응을 동시에 유도할 수 있기 때문에, 방어 면역력을 최대로 향상시킬 수 있으며, 특히 간단한 근육 주사를 통해 Th1 면역 반응을 쉽게 유도할 수 있는 것으로 알려져 있다(Pertmer, *J. Virol.*, 1996, 70:6119). 또한, 바이러스의 특정 부분만을 항원으로 이용하기 때문에 불활성 백신 또는 사백신과는 달리 부작용에 대한 위험이 없을 뿐만 아니라, 다른 방법과 비교하였을 때 플라스미드의 순수정제가 쉬우며 보관과 운반이 용이한 장점이 있다. 미국 FDA (Food and Drug Administration)에서는 1996년에 이미 AIDS에 대한 예방백신으로 DNA 백신을 인체 임상실험에 허가할 정도로 안전성을 인정하고 있다. 그러나, DNA 면역법(immunization)은 소동물 모델에서의 효과적인 면역 반응 유도에 힘입어 많은 대동물 실험이 진행되었으나, DNA 면역법만으로는 대동물 모델에서 병원성이 매우 높은 바이러스에 대한 면역성을 확보하기에 부족함이 있음을 우려하게 되었다. 이러한 예상은 HCV DNA 백신을 이용한 침팬지 실험에서 DNA백신만에 의해 유도된 항체 및 세포성 면역반응이 매우 미약하다는 사실(Forns, *Hepatology*, 2000, 32:618)로부터, 강력한 세포성 면역반응을 유도할 수 있는 또 다른 백신이 필요하다는 점을 시사하고 있다.

<33> 이러한 DNA 백신의 한계성은 널리 인식되고 있으나, 면역 반응을 정교하게 프라이밍(priming)할 뿐 아니라 Th1 면역 반응을 유도한다는 장점으로 인해, 최근 DNA로 프라이밍한 후 다른 방법으로 부스팅(boosting)함으로써 이러한 한계를 극복하고자 하는 연구가 활발히 진행되어 왔다. 그 중에서 DNA를 이용하여 1차 면역화시킨 후 재조합 단백질이나 약독화된(attenuated) 재조합 바이러스로 부스팅시켰을 때 매우 효과적이라는 연구 결과들이 보고되었는데, 이러한 시도는 소동물 모델에

서 면역 반응 증가뿐 아니라 접종(challenge) 실험을 통해서도 효과적인 방어 면역을 유도함을 보였고(Song, *J. Virol.*, 2000, 74:2920; Hanke, 1998, *Vaccine*, 16: 439-45; Sedegah, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 7648-53; Schneider, 1998, *Nat Med*, 4: 397-402), 영장류 실험을 통해서도 상기와 같은 결과를 재확인 할 수가 있었다(Kent, 1998, *J Virol*, 72: 10180-8; Robinson, 1999, *Nat Med*, 5: 526-34; Amara, 2001, *Science*, 292: 69-74). 그러나, 현재까지 C형 간염 바이러스에 대해서 재조합 아데노 바이러스 백신으로 부스팅시키고 그 효과를 확인한 보고는 없는 실정이다.

<34> 아데노 바이러스(adenovirus)는 그 안전성으로 인해 유전자 치료를 위한 벡터로 널리 이용되어 왔으나, 또 한편으로 다양한 동물모델에서 강한 체액성, 세포성 면역반응을 유도함으로써 백신으로서의 가능성이 입증되었을 뿐 아니라(Natuk, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89(16):7777; Bruce, *J. Gen. Virol.*, 1999, 80:2621), 복제에 결함이 있는 (replication-defective) 아데노 바이러스를 1회 주사한 것만으로도 오랜 기간 면역반응이 유지된다는 사실이 보고되었다(Juillard, *Eur. J. Immunol.*, 1995, 25:3467). HCV의 경우에도 HCV 구조유전자를 발현하는 재조합 아데노 바이러스를 이용하여 소동물에서 항체 및 세포성 면역 반응 유도가 가능하다는 것을 보여주었다(Makimura,

Vaccine, 1996, 14:28; Bruna-Romero, *Hepatology*, 1997, 25:470; Seong, *Vaccine*, 2001, 19:2955). 그러나, 이들 연구에서는 Th1 및 살상 세포의 유도에 있어서 우수한 효과를 나타내는 DNA 백신과의 직접적인 비교가 없었고, Th1 면역 유도에 있어서의 아데노 바이러스 백신의 효과를 검증하지 않았다. 이러한 배경하에, DNA로 프라이밍하고 재조합 아데노 바이러스로 부스팅하는 전략이 원숭이 모델에서 소개 되면서(Sullivan, 2000, *Nature*, 408: 605-9; Shiver, 2002, *Nature*, 415: 331-5), 효과적인 대안으로서 가능성을 보이게 되었다.

<35> 이러한 배경을 바탕으로, 본 발명자들은 C형 간염 바이러스에 대한 세포성 면역 반응을 가장 효과적으로 프라이밍할 수 있는 DNA 백신의 형태를 항원 조작(antigen engineering) 과정을 통해 실험적으로 찾아내었고, 이렇게 탐색된 DNA로 프라이밍한 후 재조합 아데노 바이러스로 부스팅하였을 때 가장 높은 Th1 면역 반응을 유도할 수 있다는 결과를 얻게 되었다. 궁극적으로는 이러한 백신 투여 방법이 C형 간염 바이러스에 대한 방어 면역을 유도할 수 있음을 침팬지를 이용한 효력 검증 실험을 통해서 입증하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<36> 따라서, 본 발명은 항원 조작을 통하여 C형 간염 바이러스에 대해 최적의 세포성 면역 반응을 유도할 있도록 탐색된 DNA 백신 및 재조합 아데노 바이러스 백신을 제공하는 것을 목적으로 한다.

- 37> 본 발명의 다른 목적은 상기 DNA 백신 및 제조합 아데노 바이러스 백신을 이용하여 C형 간염 바이러스에 대해 방어 면역을 유도할 수 있는 백신 투여 방법(vaccination regimen)을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- 38> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 C형 간염 바이러스의 전체 항원 유전자 중에서 2 내지 6 kb에 해당하는 유전자, 바람직하게는 2 내지 4 kb에 해당하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 함유하는 DNA 백신을 제공하고, 보다 구체적으로는 코아(Core), E1 및 E2 유전자를 포함하는 제1 플라스미드, NS3 및 NS4 유전자를 포함하는 제2 플라스미드 및 NS5 유전자를 포함하는 제3 플라스미드를 모두 함유하는 것을 특징으로 하는 DNA 백신을 제공한다.
- 39> 또한, 본 발명은 상기 제1 플라스미드에서 코아의 아미노 말단부 아미노산이 35 내지 40 개 제거된 것을 특징으로 하는 DNA 백신 및 상기 제1 플라스미드에서 E2의 막관통 도메인을 보유하는 것을 특징으로 하는 DNA 백신을 제공한다.
- 40> 또한, 본 발명은 상기 제1 플라스미드는 서열번호 50으로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 백신, 구체적으로 상기 제1 플라스미드는 pGX10 gDs Δ ST (수탁번호: KCCM 10415)인 것을 특징으로 하는 DNA 백신; 상기 제2 플라스미드는 서열번호 51로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 백신, 구체적으로 상기 제2 플라스미드는 pGX10 NS34 (수탁번호: KCCM 10417)인 것을 특징으로 하는 DNA 백신; 및 상기 제3 플라스미드는 서열번호 52로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 백신, 구체적으로 상기 제3 플라스미드는 pGX10 NS5 (수탁번호: KCCM 10416)인 것을 특징으로 하는 DNA 백신을 제공한다.

- <41> 또한, 본 발명은 상기 제1 플라스미드는 서열번호 50으로 표시되는 염기서열을 포함하고, 상기 제2 플라스미드는 서열번호 51로 표시되는 염기서열을 포함하고, 상기 제3 플라스미드는 서열번호 52로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 백신을 제공하며; 구체적으로는 상기 제1 플라스미드는 pGX10 gDs Δ ST (수탁번호: KCCM 10415)이고, 상기 제2 플라스미드는 pGX10 NS34 (수탁번호: KCCM 10417)이고, 상기 제3 플라스미드는 pGX10 NS5 (수탁번호: KCCM 10416)인 것을 특징으로 하는 DNA 백신 및 상기 DNA 백신에 pGX10 hIL-12^m 을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 DNA 백신을 제공한다.
- <42> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 C형 간염 바이러스의 전체 항원 유전자 중에서 2 내지 6 kb에 해당하는 유전자, 바람직하게는 2 내지 4 kb에 해당하는 유전자를 포함하는 아데노 바이러스를 함유하는 재조합 아데노 바이러스 백신을 제공하고, 보다 구체적으로는 코아(Core), E1 및 E2 유전자를 포함하는 제1 아데노 바이러스, NS3 및 NS4 유전자를 포함하는 제2 아데노 바이러스 및 NS5 유전자를 포함하는 제3 아데노 바이러스를 모두 함유하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신을 제공한다.
- <43> 또한, 본 발명은 상기 제1 아데노 바이러스에서 코아의 아미노 말단부 아미노산이 35 내지 40개 제거된 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신 및 상기 제1 아데노 바이러스에서 E2의 막관통 도메인을 보유하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신을 제공한다.
- <44> 또한, 본 발명은 상기 제1 아데노 바이러스는 서열번호 50으로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신, 구체적으로 상기 제1 아데노 바이러스는 rAd gDs Δ ST (수탁번호: KCCM 10418)인 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스

1/00684(16)

상기 제2 아데노 바이러스는 서열번호 54로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신, 구체적으로 상기 제2 아데노 바이러스는 rAd gDs NS34 (수탁번호: KCCM 10420)인 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신; 및 상기 제3 아데노 바이러스는 서열번호 52로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신, 구체적으로 상기 제3 아데노 바이러스는 rAd NS5 (수탁번호: KCCM 10419)인 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신을 제공한다.

본 발명은 상기 제1 아데노 바이러스는 서열번호 50으로 표시되는 염기서열을 포함하고, 상기 제2 아데노 바이러스는 서열번호 54로 표시되는 염기서열을 포함하고, 상기 제3 아데노 바이러스는 서열번호 52로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신을 제공하며; 구체적으로 상기 제1 아데노 바이러스는 rAd gDs Δ ST (수탁번호: KCCM 10418)이고, 상기 제2 아데노 바이러스는 rAd gDs NS34 (수탁번호: KCCM 10420)이고, 상기 제3 아데노 바이러스는 rAd NS5 (수탁번호: KCCM 10419)인 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신을 제공한다.

<46> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 DNA 백신으로 2 내지 5회 프라이밍한 후 상기 재조합 아데노 바이러스 백신으로 부스팅함으로써 HCV에 대한 면역력을 증진시키는 것을 특징으로 하는 백신 투여 방법을 제공한다.

<47> 또한, 본 발명은 상기 DNA 백신으로 프라이밍한 후 상기 재조합 아데노 바이러스 백신으로 부스팅함으로써 CD4⁺ Th1 면역반응을 증진시키는 것을 특징으로 하는 HCV에 대한 면역력을 증진시키는 방법을 제공한다.

1 0068496

- 8> 또한, 본 발명은 상기 DNA 백신으로 프라이밍한 후 상기 재조합 아데노 바이러스 백신으로 부스팅하는 것을 특징으로 하는 C형 간염의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- 19> 본 명세서에서 사용한 용어 중 "DNA 백신"이라 함은, 항원으로 작용할 수 있는 단백질을 암호화하는 유전자를 함유한 플라스미드 또는 상기 플라스미드와 일반적인 백신 조성에 첨가되는 약학적 성분을 포함하는 물질을 의미한다.
- 50> 또한, "프라이밍(priming)"은 초회항원자극(감작)을 의미하고, "부스팅 (boosting)"은 초회항원자극 후의 추가면역을 의미한다.
- 51> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- 52> 본 발명은 HCV 전체 유전자 서열을 한 개의 구조 단백질 영역 (Core-E1-E2) 유전자와 2개의 비구조 단백질 영역(NS3-NS4와 NS5) 유전자로 나누어 이들 각 유전자를 포함하는 독립적인 플라스미드(또는 재조합 아데노 바이러스)를 제공한다.
- 53> HCV나 HIV와 같은 RNA 바이러스는 감염과 동시에 다양한 변이체를 생산함으로써 숙주의 면역 감시를 회피한다(Shimizu YK et al, 1994, *J Virol*, 68:1494-500; Weiner A et al, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:2755; Wyatt CA et al, 1998, *J Virol*, 72:1725; Erickson AL et al, 2001, *Immunity*, 15:883). 이러한 특징은 해당 바이러스가 만성 감염을 유지하는데 중요한 메커니즘으로 알려져 있다(Farci P et al, 2000, *Science*, 288:339). 이러한 바이러스에 대해 방어 면역을 형성하기 위해서는, 다중 에피토프에 특이적인 세포성 면역 반응을 동시 다발적으로 유도하는 것이 필수적이다(Cooper, 1999, *Immunity*, 10:439; Lechmann, 2000, *Semin*

Liver Dis 20(2): 211). 이러한 논리적 근거 하에서, 해당 백신은 가능한 한 넓은 부위의 HCV 항원을 포함해야 하는데, 이를 위해서는 한 종의 DNA 백신(또는 재조합 아데노 바이러스 백신)에서 HCV 항원이 차지하는 유전자의 크기에 대한 최적화 과정이 필요하다.

- 54> 즉, 총 10종에 해당하는 HCV 유전자를 개별적인 플라스미드(또는 아데노 바이러스)에서 발현되도록 고안할 경우, 발현될 항원이 차지하는 유전자 길이에 비해 벡터의 비율이 커짐에 따라 충분한 항원의 발현을 위해서는 과량의 DNA를 사용해야 하는 문제점, 나아가 임상 수준에서의 연구를 위한 백신 생산 공정이나 독성 실험 등을 고려할 때 비효율적이라는 문제점이 있다. 이와 반대로 전체 HCV 유전자를 하나의 플라스미드(또는 아데노 바이러스)에서 발현시킬 경우, 전사 및 해독의 과정에서 발현이 비효율적으로 일어남으로 인해 효과적인 세포성 면역 반응 유도에 부적절할 수 있을 뿐 아니라, DNA를 생산 정제하는 과정에서 DNA의 안정성에 문제를 야기하는 문제점이 있다. 따라서, 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해서는 어느 정도의 삽입 크기(insert size)를 갖는 DNA 백신이 세포성 면역 반응을 가장 효율적으로 유도할 수 있는지에 대하여 탐색되어야 한다. 탐색의 전략은 가능한 한 넓은 영역의 유전자를 동시에 간직 하면서, 단일로 발현시키는 백신에 비해 세포성 면역 반응의 유도가 감소되지 않는 적절한 크기의 DNA 백신을 찾는 것이다. 이러한 탐색 과정을 통해 전체 HCV 유전자 중에서 2 내지 6 kb에 해당하는 유전자를 포함하는 플라스미드(또는 아데노 바이러스)가 효율적임을 밝히고, 바람직하게는 2 내지 4 kb에 해당하는 유전자를 포함하는 플라스미드(또는 아데노 바이러스), 가장 바람직하게는 1개의 구조 단백질 영역(Core-E1-E2)과 2개의 비구조 단백질 영역(NS3-NS4와 NS5)을 포함하는 개별적인 3개의 플라스미드(또는 재조합 아데노 바이러스)를 모두 함유하는 백신을 고안하게 되었다. 현재까지 보고된 바에 의하면, 유전자형이 다른 다수의 HCV, 예를 들어, HCV-1, HCV-J 등이 존재한다고 알려져 있고, 이들 다수의 HCV를 구성하는 구조단백질은

코아, E1, E2로, 그리고 비구조단백질은 NS2, NS3, NS4 및 NS5로 모두 이루어져 있다고 알려져 있다. 본 발명에서 플라스미드(또는 아데노 바이러스) 내에 함유되는 2 내지 6 kb 크기의 HCV 유전자는 유전자형에 따른 특별한 제한이 있는 것은 아니다.

- 55> 본 발명은 HCV의 구조유전자인 코아(Core)의 아미노 말단부 아미노산이 35 내지 40개 제거되고, E1 및 E2 유전자를 포함하는 플라스미드(또는 재조합 아데노 바이러스)를 제공한다. 여기에서 상기 제거되는 아미노산은 40개가 바람직하고, 상기 E2는 막관통 도메인을 그대로 간직한 유전자가 바람직하다.
- 56> HCV의 코아(Core) 영역은 전체 단백질 부분 중에서 여러 가지 다른 타입(type)간의 아미노산 상동성이 가장 높은 부위이기 때문에, 이종 감염(heterologous infection)에 대한 백신 개발의 표적이 되어왔다 (Shirai M. 1994, *J Virol*, 68:3334-42; Inchauspe G., 1995, *J Virol*, 69:5798-5805; Wands JR, 1996, *Hepatology*, 24:14-20; Geissler M., 1997, *J Immunol*, 158:1231-7; Arichi T, 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:297-302; Polakos NK., 2001, *J Immunol*, 166(5):3589-3598). 그러나, HCV 코아(Core)에 의한 면역 저해 효과에 대한 보고가 발표됨에 따라(Large, 1999 *J Immunol* 162:931-8, Lee, *Virology*, 2001, 279:271), 본 발명자들은 코아(Core)의 면역원성은 그대로 유지하면서 면역 저해 기능을 제거하기 위해 아미노 말단부의 35 내지 40개 아미노산을 제거한 백신을 고안하게 되었으며, 특히 40개 아미노산이 제거된 백신이 바람직하다.

1000068496

7> 또한, HCV의 외피 단백질을 백신 용도로 사용하는 경우, 일반적으로 항체 반응을 유도하기 위해 세포밖으로 분비될 수 있도록 E2의 막관통 도메인을 제거한 DNA를 사용하곤 한다. 그러나, 항체 반응이 HCV에 대한 방어 면역을 제공하지 못하리라는 보고(Cooper, 1999, *Immunity*, 10:439; Esumi, 2002, *Vaccine*, 20: 3095-3103)와 더불어, E2의 막관통 도메인을 그대로 간직한 DNA가 제거한 DNA보다 높은 세포성 면역 반응을 유도할 수 있었기 때문에, 위와 같은 형태의 DNA 백신(또는 재조합 아데노 바이러스 백신)을 고안하게 되었다.

58> 본 발명자들은 HCV DNA 백신으로 사용하기 위해, pGX10 gDs Δ ST (수탁번호: KCCM 10415), pGX10 NS34 (수탁번호: KCCM 10417), pGX10 NS5 (수탁번호: KCCM 10416)의 플라스미드를 개발하였고, 이들 플라스미드를 모두 함유하는 백신을 HC102라 명명하였다(도 2). pGX10 gDs Δ ST는 HCV의 캡시드 단백질(core protein)을 암호화하는 코아(Core) 유전자와 막 단백질(envelope protein)을 암호화하는 E1과 E2 유전자를 포함하고, pGX10 NS34는 HCV의 비구조 단백질 3과 4 (NS34)에 대한 유전자를, pGX10 NS5는 비구조 단백질 5 (NS5)에 대한 유전자를 포함한다. 또한 소동물 모델에서 HCV DNA 백신의 면역원성을 증가시키는 것으로 알려진 IL-12 변이체 DNA (pGX10 mIL-12^m) (Ha, 2002, *Nat Biotechnol*, 20: 381-6)가 상기 HC102에 포함될 수 있으며, pGX10 hIL-12^m이 포함된 DNA 백신을 HC103이라 명명하였다(도 3).

59> 본 발명자들은 AIDS DNA 백신에 함유되는 면역원성 플라스미드를 위한 기본 벡터를 개발하였으며, 이를 pGX10으로 명명하였다. 본 발명의 벡터 pGX10은 도 2에 도시된 바와 같이, 시미안 바이러스 40 복제원(SV40 ori), 사이토메갈로바이러스 (CMV) 초기 프로모터/인핸서 서열, 아데노 바이러스 삼부 리더 서열(TPL), 멀티 클로닝 부위(MCS), 시미안 바이러스 40 폴리아데닐화 서열(SV40PA), 시미안 바이러스 40 인핸서 서열(SV40Eh), 플라스미드가 대장균에서 증식

할 수 있도록 ColE1 Ori 및 카나마이신 내성 유전자(KanR)로 구성되어 있는 것을 특징으로 하며, 다수의 특정 제한 부위를 포함하는 3.6kb의 신규한 벡터이다. 본 발명의 벡터 pGX10은 본 발명자들이 기존에 이미 발표한 pTX (Lee, *Vaccine* 17:473-9, (1999))를 기초로 하여 제작되었고, 이미 소동물(small animal) 연구에서 DNA 백신 벡터로 사용된 바 있는 pTV2 벡터(Lee, 72,8430(1998); Cho, *Vaccine* 17,1136(1999))를 출발 벡터로 사용하여 공지된 방법으로 제조할 수 있으며, 국제기탁기관 KCTC에 수탁번호 제10212BP호로 기탁되었다. 한편, 상기 프로모터의 종류 및 당단백질 신호서열의 종류 및 길이 등은 본 발명의 실시 목적에 따라 다양하게 변형할 수 있음은 당업자에게 자명할 것이다. 예를 들면, 프로모터의 경우 바이러스성 프로모터인 RSV 프로모터, 세포성 프로모터인 EF1, MCK(muscle specific promoter), LCK(T cell specific promoter) 등이 사용될 수 있고, 당단백질의 경우는 VZV(varicella zoster virus) gB, HCMV(human cytomegalovirus) gH, gL, gO, VSV(vesicular stomatitis virus) G 단백질, 로타바이러스 외막 캡시드 당백질(rotavirus outer capsid glycoprotein), VP7 등으로 대체하여 사용될 수 있다.

<60> 본 발명의 플라스미드는 DNA의 분해(degradation)를 방지하고 세포내로의 투여를 촉진시키기 위하여, 바람직하게는 DMRIE/DOPE와 같은 양전하 지질(cationic lipid)과 복합체를 형성할 수 있다. 플라스미드 DNA는 약학적 물질(drug substance)로 간주될 수 있으며, 잘 특성화된(well-characterized) 대장균 숙주에서 생산될 수 있다. 세포에 도입되면 플라스미드에 존재하는 재조합 유전자가 발현되어 생화학적 활성을 갖는 유전자 산물을 생산하게 된다. 약학적 물질을 생산하기 위하여, 플라스미드 DNA는 주입 운반체(injection vehicle)에서 지질 DMRIE

및 DOPE이 함께 혼합된다. DMRIE/DOPE 지질 복합체는 전체적으로 양전하를 띄며, 따라서 음전하를 띄는 DNA와 결합할 수 있다. 결과적으로 생성되는 플라스미드 DNA와 지질 복합체는 직접 세포에 주입된다.

이에 능숙한 당업자라면 상기에서 언급한 본 발명의 플라스미드가 바람직한 실시예인 것이며, 본 발명의 범위를 제한하려는 의도가 아님을 인지할 것이다. 또한, 대표 산물을 획득하기에 적당하며 상기에서 언급한 장점들을 가지는 모든 발현 벡터의 범주에 포함된다.

<62> 또한, 본 발명은 HCV의 구조유전자인 코아, E1 및 E2 유전자와 비구조 유전자 NS3과 NS4, 그리고 비구조 유전자 NS5를 포함하는 각각의 독립적인 재조합 아데노 바이러스를 제공한다(도 4). 이때, 재조합 아데노 바이러스는 HCV 유전자를 발현하는 상기 플라스미드와 동일한 HCV 유전자 구성 및 영역을 포함한다.

<63> 본 발명의 재조합 아데노 바이러스는 통상적인 아데노 바이러스의 기반에 상기에서 명시한 HCV 유전자를 포함하는 것을 특징으로 한다. 본 발명자들은 HCV 아데노 바이러스 백신을 제조하기 위하여, 아데노 바이러스의 복제에 반드시 필요한 E1 유전자가 제거되어 복제 능력이 상실된(replication defective) 아데노 바이러스 벡터 내에, HCV 항원 유전자인 gDs Δ ST, gDsNS34, NS5가 동일하게 들어간 재조합 아데노 바이러스를 개발하였고, 이를 각각 rAd gDs Δ ST (수탁번호: KCCM 10418), rAd gDsNS34 (수탁번호: KCCM 10420), rAd NS5 (수탁번호: KCCM 10419)라 명명하였으며, 전체를 혼합한 백신을 rAd-HC102라 명명하였다.

- <64> 본 발명에서 사용되는 백신 조성물의 "면역학적 유효" 용량은 단일 투여 또는 중복 투여의 일부로서 상기 양의 투여가 예방 또는 치료에 효과적인 것을 의미한다. 구체적인 투여량은 치료될 개인의 건강 및 신체적 조건, 치료될 개인의 분류군 (예를 들면, 인간, 비인간 영장류, 영장류 등), 효과적인 면역 반응을 증가시킬 개인의 면역 시스템의 능력, 목적 보호 정도, 백신의 제형, 치료의 평가, HCV 감염 계통 및 다른 관련 인자에 의존하여 다양하다. 상기 양은 일상적인 시도를 통해 결정될 수 있는 비교적 폭넓은 범위에 해당할 것으로 기대된다. 본원 백신의 대상 투여량은 통상적으로 투여당 약 $1\mu\text{g}$ 내지 20 mg 의 범위이다. 상기 기재된 방법 및 당업계에 잘 알려진 다른 방법을 기준으로 하여 최대 효과를 달성하기 위해 투여량을 조절하는 것은 당업자에게는 용이한 일이다.
- <65> 백신은 단일 투여 스케줄 또는 바람직하게는 중복 투여 스케줄로 투여될 수 있다. DNA 백신과 재조합 아데노 바이러스 백신의 중복 투여 스케줄은 하기 하는 바와 같이, DNA 프라이밍-rAd 부스팅 면역 방법이 바람직하다.
- <66> 백신 조성물은 식물성 오일 또는 이의 에멀션, 계면활성제, 예를 들면, 헥사데실아민, 옥타데실 아미노산 에스테르, 옥타데실아민, 라이소레스틴, 디메틸-디옥타데실암모늄 브로마이드, N,N-디옥타데실-N'-N' 비스(2-하이드록시에틸-프로판디아민), 메톡시헥사데실글리세롤 및 플루로닉 폴리올; 폴리아민, 예를 들면, 피란, 텍스트란셀페이트, 폴리 IC 및 카보폴; 펩타이드, 예를 들면, 류라밀 디펩타이드, 디메틸글라이신 및 터프트신; 면역 자극 복합체; 오일 에멀션; 리포폴리사카라이드, 예를 들면, MPLR(3-O-탈아실화 모노포스포릴 리피드 A; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Montana); 및 미네랄 겔 같은 부가적인 보조제를 임의로 포함할 수 있다. 본 발명의 플라스미드 또는 재조합 아데노 바이러스는 또한 리포솜, 와우상(cocleates), 생분해성 중합체, 예를 들면 폴리-락타이드, 폴리-글리콜라이드 및 폴리-락타

이드-코-글리콜라이드 또는 ISCOMS(면역자극 복합체) 중으로 혼입될 수 있고, 보충성 활성성분이 또한 사용될 수 있다. 본 발명의 플라스미드는 또한 세균 독소 및 이의 약독화 유도체와 함께 투여될 수 있다.

<67> 백신은 비경구, 동맥내, 피내, 경피(서방형 중합체의 사용 등에 의해), 근육내, 복강내, 정맥내, 피하, 경구 및 비내 투여경로(이에 국한되지 않음)를 포함하여 다양한 경로에 의해 인간이나 동물에 투여될 수 있다. 이러한 백신에 사용되는 항원의 양은 항원의 동질성에 따라 변동될 것이다. 본 백신에 적용하기 위한 통상의 캐리어 항원과 함께 사용되는 설정용량 범위의 조정과 조작은 당업자의 역량 안에 있다.

<68> 또한, 본 발명은 상기 DNA 백신으로 프라이밍한 후 상기 재조합 아데노 바이러스 백신으로 부스팅함으로써 HCV에 대한 면역력을 증진시키는 것을 특징으로 하는 백신 투여 방법을 제공한다.

<69> 면역력을 증진시키기 위해서는 DNA 백신만으로 대상에 주사하거나, 재조합 아데노 바이러스 백신만으로 대상에 주사하거나, 재조합 아데노 바이러스 백신으로 프라이밍한 후 DNA 백신으로 부스팅하거나, 또는 DNA 백신으로 프라이밍한 후 재조합 아데노 바이러스 백신으로 부스팅할 수 있다. 그러나, HCV에 대한 최적의 면역 증진 효과를 얻기 위해서는 먼저 DNA 백신으로 프라이밍한 후 재조합 아데노 바이러스 백신으로 부스팅하는 것이 가장 효과적이다. DNA 백신의 프라이밍 횟수로는 2 내지 5회가 적절하고, 침팬지 실험에서 검증된 바와 같이 3회의 DNA 프라이밍과 1회의 아데노 바이러스 부스팅이 바람직하다.

70> HCV에 대한 최적의 면역 증진 효과를 얻기 위해서는 pGX10 gDs Δ ST (수탁번호: KCCM 10415), pGX10 NS34 (수탁번호: KCCM 10417), pGX10 NS5 (수탁번호: KCCM 10416)를 모두 함유하는 DNA 백신 또는 상기 DNA 백신에 pGX10 hIL-12^m 을 추가로 함유하는 DNA 백신으로 3회 프라이밍한 후, rAd gDs Δ ST (수탁번호: KCCM 10418), rAd gDs NS34 (수탁번호: KCCM 10420), rAd NS5 (수탁번호: KCCM 10419)를 모두 함유하는 재조합 아데노 바이러스 백신으로 1회 부스팅하는 것이 가장 바람직하다.

<71> 또한, 본 발명은 상기 DNA 백신 및(또는) 재조합 아데노 바이러스 백신을 투여하여 C형 간염을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

<72> 본 발명의 DNA 백신 및(또는) 재조합 아데노 바이러스 백신으로 C형 간염을 예방 또는 치료하는 방법은 DNA 프라이밍-rAd 부스팅 방법이 가장 적합하고, 상기 방법은 세포성 면역 반응, 즉 CD4⁺ Th1 면역반응 및 살상 세포 반응 유도에 모두 효율적이다. 특히, HCV 바이러스의 제거 및 질병회복에 가장 중요하다고 알려진 CD4⁺ Th1 면역반응을 유발하는데 있어서도 DNA 프라이밍-rAd 부스팅 방법이 특히 효율적이므로, 상기 방법은 HCV에 대한 예방 및 치료에 유용하게 적용될 수 있다.

<73> 본 발명자들은 제조된 HCV DNA 백신과 재조합 아데노 바이러스 백신이 항원을 제대로 발현하는지를 확인하기 위하여, 대조 벡터인 pGX10을 포함하여 pGX10 gDs Δ ST, pGX10 NS34와 pGX10 NS5로 COS-7 동물 세포(ATCC CRL-1651)를 형질전환 (transfection)시킨 후, 형질전환된 세포를 수확하여 코아, E2, NS3, NS4 및 NS5의 발현을 각 항원에 특이적인 항체를 각각 사용하

여 웨스턴 블롯(Western blot) 방법으로 확인하였다. 또한, 293A 세포를 이용하여 생산 및 정제한 대조 바이러스인 rAd-목(mock)을 포함하여 rAd gDs Δ ST, rAd gDsNS34 및 rAd NS5를 COS-7 세포에 감염시킨 후 세포를 수확하여 각 항원의 발현을 상기에서 서술한 항체를 이용하여 웨스턴 블롯 방법으로 확인하였다.

74> 그 결과, 대조백터인 pGX10과 대조바이러스인 rAd-목(mock)과는 달리 pGX10 gDs Δ ST, pGX10 NS34와 pGX10 NS5 또는 rAd gDs Δ ST, rAd gDsNS34 및 rAd NS5를 주입한 후에 배양된 동물 세포에서는, HCV 코아 단백질과 E2, NS3, NS4 및 NS5 단백질이 발현되었으므로, 본 발명의 플라스미드 및 재조합 아데노 바이러스는 동물의 몸에 주입되었을 때도 HCV 항원 단백질을 효과적으로 발현시킬 수 있음을 확인할 수 있었다(도 5 내지 도 8).

<75> 본 발명자들은 본 발명의 플라스미드 pGX10 gDs Δ ST와 pGX10 mL-12 변이체(mutant)를 DNA 백신으로 이용하고, rAd gDs Δ ST를 재조합 아데노 바이러스 백신으로 이용하여 동물실험을 수행하였다. HCV 바이러스의 제거 및 질병회복에 가장 중요하다고 알려진 CD4+ Th1 면역반응을 어떠한 백신 방법이 가장 잘 유도할 수 있는지를 조사하기 위하여, CD4+ T세포만을 분리하여 IFN- γ 와 IL-4 ELISPOT(Enzyme-linked immunospot)를 수행하였다. 사이토카인 IFN- γ 는 활성화된 T 세포에서 분비되는 대표적인 Th1 사이토카인이다. 반면, 사이토카인 IL-4는 B 세포의 분화 및 Th2 면역반응을 유도하는 대표적인 사이토카인이다. 이들 사이토카인을 분비하는 세포의 수를 정량적으로 조사할 수 있는 ELISPOT 실험을 수행한 결과, HCV E2 및 코아 단백질 항원 모두에 대해 DNA 프라이밍-rAd 부스팅 방법이 다른 백신방법에 비해 가장 높은 수치의 IFN- γ 를 생산하는 CD4+ T 세포를 보여주었다(도 13의 A 및 도 13 B의 G2, $p < 0.001$). DNA만을 두번 처리했을 때 E2에 대해서는 특이적인 IFN- γ 를 생산하는 CD4+ T 세포가 거의 생성되지

않은 반면(도 13의 A, G1), 코아 단백질에 대해서는 rAd를 두 번 처리한 그룹과 비슷한 정도로 IFN- γ 를 생산하는 CD4+ T 세포의 생성을 유도하였다(도 13의 B, G1). 이는 코아 단백질 항원 자체가 E2와는 달리 DNA 백신 처리만으로도 효과적으로 CD4+ T 세포의 면역을 유도할 수 있기 때문인 것으로 생각된다. 대조적으로, IL-4 ELISPOT를 수행하였을 때는 모든 그룹에서 코아 및 E2 단백질에 특이적으로 반응하여 IL-4를 합성하는 CD4+ T 세포가 거의 검출되지 않았는데(도 13의 C 및 도 13의 D), 이는 전반적으로 DNA 백신과 아데노 바이러스 백신이 Th2 보다는 Th1 CD4+ T 세포의 면역반응을 유도하기 때문인 것으로 생각된다. 상기 결과로부터, 본 발명자들은 아데노 바이러스 백신을 두 번 주입하거나 재조합 아데노 바이러스 백신을 주입한 후 DNA 백신으로 부스팅하는 방법보다 DNA 백신을 주입한 후 재조합 아데노 바이러스 백신으로 부스팅하는 방법이 CD4+ Th1 면역반응을 유도하는데 가장 적합하다는 것을 확인하였다.

<76> 아울러, HCV E2에 특이적인 ^{51}Cr 방출 세포독성 분석(release cytotoxic assay)을 수행하여 CD8+ T 세포의 살상 세포 반응을 조사한 결과, 아데노 바이러스를 두 번 주입하는 방법과 DNA 프라이밍-rAd 부스팅 방법이 서로 큰 차이 없이 가장 효과적인 방법임을 확인하였다(도 14 참조, G2 및 G3). rAd 프라이밍-DNA 부스팅 방법과 DNA를 2번 주입하는 방법도 특이적인 살상 세포 반응을 나타내지만, 상기의 두 방법만큼 효과적이지 못하였다(도 14 참조, G1 및 G4). 상기 결과는 살상 세포 반응의 유도에도 DNA 프라이밍-rAd 부스팅 면역 방법이 가장 효율적임을 의미한다.

또한 본 발명은 HCV에 대한 유일한 실험동물 모델인 침팬지에서 방어 면역을 유도한 후 감염성 HCV에 대한 바이러스 증식 억제 여부를 조사함으로써 실질적인 효과를 입증하였다.

이와 같은 전략으로 완성된 DNA 백신 및 재조합 아데노 바이러스 백신을 이용하여 유도되는 세포성 면역 반응의 강도를 조사하고, 감염성 C형 간염 바이러스를 접했을 때 백신에 의해 유도된 면역 반응이 C형 간염 바이러스의 증식을 얼마나 억제할 수 있는지를 조사하였다.

실험자들은 HCV에 대한 DNA 백신으로 3회에 걸쳐 주사함으로써 면역 반응의 충분한 증진을 유도한 후, 재조합 아데노 바이러스를 이용하여 부스팅함으로써 세포성 면역 반응을 효과적으로 증가시키려고 했다. 이때, 세포성 면역 반응의 기억 반응(memory immune response)을 증가시켜 준다고 입증된 hIL-12 변이체의 동시 투여 효과를 비교하고자 하였다. 실험군 1은 pGX10 gDs ΔST, pGX10 NS34, pGX10 NS5의 혼합물 백신 HC102를 투여하였고, 실험군 2는 pGX10 gDs ΔST, pGX10 NS34, pGX10 NS5외에 pGX10 hIL-12^m DNA를 첨가한 HC103를 투여하였다. 3회의 DNA 백신을 주사한 후, 30주 시점에 실험군 1과 동일한 부분을 발현하는 재조합 아데노 바이러스 rAd-HC102로 부스팅을 실시했고, 그로부터 2주 후 시점에서 세포성 면역 반응을 조사하였다. 세포성 면역 반응을 조사하는 방법 중에서 가장 민감한 방법이라고 알려진 IFN-γ ELISPOT 분석으로 조사한 결과 (도 16참조), 백신을 투여한 침팬지 6마리 중 4마리에서 강한 반응을 보였고, 나머지 2 마리는 다소 미약한 반응을 보였다. 본 결과에서 실험군 1과 2의 차이는 관찰되지 않았다. 이때, 아무것도 처리하지 않은 대조군중 한 마리 (#404)가 비교적 높은 수준의 세포성 면역 반응을 보였다. 이러한 사실은 대조군 침팬지가 이전에 HCV에 노출되었음을 암시하는 결과이고, 뉴욕 혈액 센터 (New York Blood Center)에서 최근 연구된 연구 결과와 일치하고 있다. 초기에 대조군을 선별하는 기준은 HCV에 대한 항체 반응이 없고, HCV

바이러스가 존재한 기록이 없어야만 한다. 위 대조군에 속한 침팬지들은 모두 이러한 기준을 만족하지만, 감염량이 하 농도(subinfectious dose)의 HCV로 노출된 경우, 바이러스혈증(viremia)은 나타나지 않지만 세포성 면역 반응은 유도된다는 결과(Shata MT, 2002, , P-215)로부터 위와 같은 추론이 가능하다.

<80> 도 16의 실험결과가 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포의 활성을 동시에 표현하는 것이라면, 도 17와 도 18은 CD4+ T 세포만의 활성을 조사한 결과를 보여준다. Th 1 반응의 지표로서 CD4+ T 세포에 의해 분비되는 IFN- γ 의 양을 조사한 결과, 실험군 1에서 비교적 높은 반응을 보였고, 실험군 2에서는 비교적 낮으나 대조군에 비해 높은 반응을 보였다. 또 하나의 CD4+ T 세포 반응인 증식 반응 (T cell proliferative response)에서는 역시 실험군 1이 실험군 2에 비해 비교적 높은 반응 수치를 보인데 반해, 대조군에서는 미약한 반응을 보였다. 이때, 대조군중 한 마리(#406)는 백신을 투여한 침팬지와 유사한 정도의 증식 반응을 보였는데, 이는 위에서 설명한 HCV의 사전 노출(previous exposure of subinfectious dose of HCV)을 의미한다.

<81> 이러한 세포성 면역 반응의 유도 정도가 실제 바이러스의 증식 억제에 얼마나 효율적인가를 조사하기 위해, 100 CID₅₀ 농도의 감염성 HCV-bk로 이종 접종(heterologous challenge)을 시도하였다. 이때의 실험 조건은 다음과 같은 문제점을 해결하기 위해 고안되었다. 첫째, 본 발명에 의해 유도된 세포성 면역 반

응이 면역화 후 오랜 시점이 지나서도 방어 효과를 나타낼 수 있는지를 확인하여야 한다. 백신을 투여한 후 해당 병원균이 침입하는 시기는 언제가 될지 가늠할 수 없으므로, 효과적인 백신으로 평가 받기 위해서는 투여 후에도 오랜 기간 동안 방어 면역력을 유지할 수 있어야만 하는 것이다. 이러한 점을 확인하기 위해, 통상적으로 마지막 면역화 후 3-4주 시점에서 시행되던 접종(challenge)을 면역 반응이 누그러진 12주 후에 실시함으로써, 기억 반응(memory response) 수준이 낮아진 면역력이 실제의 HCV 감염을 예방할 수 있는지를 조사하였다. 둘째, 과량의 감염원으로부터 방어가 가능할 것인가를 확인하여야 한다. 과량의 HCV에 대해 방어하기 위해서는 그만큼의 강력한 세포성 면역 반응이 필요할 뿐만 아니라, 초기 접종물(challenging inoculum)에 존재하는 변이체(Wyatt CA 1998 *J Virol* 72:1725)의 다양성 또한 그만큼 증가할 수 있기 때문에, 이러한 변이체에 대한 억제력도 간직하고 있어야만 한다. 이점을 확인하기 위해, 접종(challenge)하는 감염원의 양을 100 CID₅₀으로 시행하였다. 마지막으로, 여러 가지 다양한 변이체 뿐 아니라 다른 종류의 HCV에 대해서도 방어(heterologous protection)가 가능한지 확인할 필요가 있다. 이점을 규명하기 위해 같은 타입의 이중 감염원으로 접종(heterologous challenge)을 실시하였다. 그 결과, 대조군에서는 감염 후 2주 시점에서 10⁵-10⁶에 해당하는 바이러스의 증식 정도를 보인 반면, 실험군에서는 6마리중 5마리의 침팬지에서 거의 바이러스가 검출되지 않았다. 두 마리의 침팬지(#400, 381)는 바이러스의 수치가 경계치(borderline positive)에 해당하는데, 확인을 위한 반복 실험에서는 검출이 되지 않았다. 이는 거의 검출치 이하의 값이거나 검출치 이상이라 하더라도 대조군에 비해 매우 낮은 수치의 바이러스 증식을 의미하는 것이다. 38마리의 침팬지를 사용하여 HCV의 감염 후 역학을 조사한 보고에 의하면, 최대 바이러스량 (peak viral load)의 값은 10^{5.74}-10^{5.82}의 값을 보인다 (Prince AM, 2002,

9th International Meeting on HCV and Related Viruses, P-259). 따라서, 위 결과는 기존의 통계치나 본 실험의 대조군과 비교해 보았을 때, 본 발명에 의한 방어 면역 효과를 감염 초기 시점의 침팬지에서 보여준 결과라고 할 수 있다.

<82> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

<83> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<84> 본 발명의 실시예에서 사용되는 유전자의 재조합 과정에서의 반응조건은 다음과 같다.

<85> (1) 제한효소의 처리

<86> 하기 실시예에서 모든 제한효소의 처리는 다음과 같이 수행하였다. 플라스미드 DNA 또는 정제된 PCR 산물 $2\mu\text{g}$ ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$)을 제한효소 (모든 제한효소는 Takara Shuzo Co.,Ltd 및 New England Biolab, Inc의 제품을 사용함) 20 unit ($2\mu\text{l}$)으로 처리하였으며, 상기 제한효소 제조 회사가 공급한 완충용액 (10배 농축액)을 함께 첨가한 후 최종 부피가 $50\mu\text{l}$ 가 되도록 증류수를 넣어 37°C 항온기에서 2시간 동안 반응시켰다.

<87> (2) DNA 절편의 결합 및 대장균의 형질전환

<88> 제한효소로 처리한 DNA 용액을 0.8% 아가로스 겔 (GIBCO-BRL)에서 전기영동하였으며 목적하는 크기의 DNA 절편을 포함하는 아가로스 조각을 잘라 겔 추출 키트(Gel Extraction Kit; QIAGEN 사)를 사용하여 순수 분리하였다. DNA 절편들을 T4 DNA 리가제 (Takara)와 제조사가 제공한

완충용액을 넣고 16℃ 항온기에서 10시간 결합시켰다. 결합시킨 DNA는 샘브룩 등의 방법 (Sambrook et al., *Molecular Cloning*, 2nd Ed. 1989)에 따라 대장균에 형질전환하였다.

89> (3) 형질 전환된 대장균에서 결합된 플라스미드를 가진 DNA의 확인 및 정제

90> 형질 전환한 대장균에서 샘브룩 등의 방법에 따라 DNA를 소량 정제하고, 목적인 플라스미드가 결합된 것인지를 목적인 DNA의 제한효소지도를 바탕으로 제한효소로 잘라서 그 크기를 확인한 후, 순수한 DNA를 대량으로 얻었다.

91> (4) PCR 증폭

92> 모든 PCR 증폭은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 두 가지 올리고뉴클레오타이드 (프라이머)를 각 200 pmol, 주형 DNA 20 ng, 타카라(Takara) exTaq (폴리머라제) 10 unit, 타카라 (Takara) exTaq 10x 완충용액 5 μ l, 2.5 mM dNTP 혼합물 5 μ l 와 증류수를 넣고 최종 부피가 50 μ l가 되도록 하였다. PCR 방법은 모든 PCR에서 예비변성(predenaturation) 94℃ 4분, 변성 94℃ 1분, 어닐링(annealing) 52℃ 1분, 중합(polymerization) 72℃에서 목적 증폭산물 크기 kb 당 1분 (0.5kb 증폭시 0.5분, 3kb 증폭시 3분), 변성에서부터 중합까지 30회(cycle), 그리고 최종 연장(extension)을 72℃에서 5분간 수행하였다. PCR 기계는 퍼킨 엘머 (Perkin Elmer)사의 기종 (GeneAmp PCR system 2400)을 사용하였다. 얻어진 PCR 산물은 아가로즈 전기영동 후 퀴아젠(QIAGEN)사의 겔 추출 키트를 사용하여 제품에서 제공하는 방법으로 정제하였다. 이후 생성물을 상기 제한효소 처리과정에서와 같이 제한효소로 잘라 다른 절편 DNA나 또 다른 PCR 생성물과 결합하는 클로닝 작업에 사용하였다.

93> 기타, 유전자 재조합에 관한 실험들로서 상기에 특별히 명시되지 않은 것들은 상기 샘플링 등의 방법에 소개된 방법들에 최소한의 변형을 가하여 실시하였다.

94> <실시예 1> 본 발명에 사용된 플라스미드의 제작

95> 본 발명자들은 본 발명에서 사용한 HCV 플라스미드들(도 1 내지 도 4 참조)을 다음과 같이 제작하였다.

96> (1-1) pTV2 ST의 제작

97> pTV2 벡터(Lee, *J. Virol.*, 72, 8430 (1998); Cho, *Vaccine*, 17,1136 (1999))를 PstI과 XbaI로 절단하여 4.73kb의 벡터를 분리하였다. 본 발명자들이 분리한 한국형 HCV 유전자(대한민국 특허등록 제120928호 참조)를 주형으로 하여 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머로 증폭한 PCR 산물을 PstI과 XbaI 제한효소로 절단하여 2.21kb의 삽입체(insert)를 얻은 후, 상기 4.73kb의 벡터와 결합시킴으로써 pTV2 ST를 제작하였다.

98> (1-2) pTV2 ΔST의 제작

99> pTV2 벡터(Lee, *J. Virol.*, 72, 8430 (1998); Cho, *Vaccine*, 17,1136 (1999))를 XbaI로 절단한 후, CIAP(Calf intestinal alkaline phosphatase) (Takara)로 처리하여 4.78kb의 벡터를 분리하였다. 상기 실시예 (1-1)에서 제조한 pTV2 ST를 주형으로 하여 서열번호 3 및 서열번호 2의 프라이머로 증폭한 PCR 산물을 XbaI 제한 효소로 절단하여 2.07kb의 삽입체를 얻은 후, 위에서 얻은 벡터와 결합시킴으로써 pTV2 ΔST를 제작하였다.

00 (1-3) pTV2 gDsE2t의 제작

▼ gDs의 제작

헤릭스 바이러스 타입 1 (Herpes simplex virus type 1)의 당단백질 D의 신호서열 (Lee, 1994, *J. Virol.*, 68: 766)을 서열번호 40 및 서열번호 41의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후, pBluescript SK(+) 벡터 (Stratagene)를 EcoR V로 절단하고 상기 PCR 산물을 벡터에 삽입함으로써 pSK gDs를 제작하였다 (Lee, 1998 *J Virol* 72: 8430).

103> (1-3-2) pTZ HCV의 제작

104> HCV의 전체 염기 서열을 간직하는 플라스미드를 제작하기 위해, 한국형 HCV 유전자(대한민국특허등록 제120928호 참조)를 주형으로 서열번호 42 및 서열번호 43의 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다. 얻어진 단편을 제한효소, Hind III, Xba I으로 절단한 뒤에, 동일한 효소들로 절단된 pTZ 벡터 (Sigma)에 삽입하여 pTZ SN2을 제작하였다. 이렇게 제조된 pTZ SN2를 SphI으로 절단하고 나서 XbaI으로 절단하여 5.8kb의 벡터를 얻었다. pTV NS345 (Cho, 1999, *Vaccine*, 17:1136-44)를 XbaI으로 절단한 후, 다시 SphI으로 부분 절단하여 6.35kb의 삽입체를 분리하고, 위에서 얻은 5.8kb의 벡터와 결합시킴으로써 pTZ HCV를 제작하였다.

<105> (1-3-3) pTV2 gDsE2t의 제작

<106> 상기 실시예 (1-3-1)에서 제조한 pSK gDs를 BglIII와 EcoRI 으로 절단하여 벡터로 사용하고, 상기 실시예 (1-3-2)에서 제조한 pTZ HCV를 주형으로 하여 서열번호 4 및 서열번호 5의 프라이머로 PCR 증폭한 후, BglIII와 EcoRI 으로 절단하여 위에서 얻은 벡터와 결합시킴으로써 pTV2 gDsE2t를 제작하였다 (Lee, *J. Vol.*, 72: 8430).

- .07> (1-4) pTV2 gDsST의 제작
- .08> (1-4-1) pTV2 gDs의 제작
- 109> 상기 실시예 (1-3)에서 제조한 pTV2 gDsE2t를 SpeI과 EcoRV 제한효소로 절단한 후 3.62kb의 벡터를 얻었다. 상기 pTV2 gDsE2t를 주형으로 하여 서열번호 44 및 서열번호 45의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하여 얻은 1.28kb 삽입체를 위에서 얻은 벡터와 결합시킴으로써 pTV2 gDs를 제작하였다.
- 110> (1-4-2) pTV2 gDsST의 제작
- 111> 상기 실시예 (1-4-1)에서 제조한 pTV2 gDs를 AscI과 XbaI으로 절단하여 4.86kb의 벡터를 얻었다. 상기 실시예 (1-1)에서 제조한 pTV2 ST를 주형으로 하여 서열번호 6 및 서열번호 7의 프라이머로 PCR 증폭한 후 AscI과 XbaI으로 절단하여 위에서 얻은 벡터와 결합시킴으로써 pTV2 gDsST를 제작하였다.
- <112> (1-5) pTV2 gDsE2의 제작
- <113> 상기 실시예 (1-4)에서 제조한 pTV2 gDsST를 AscI과 XbaI으로 절단하여 4.86kb의 벡터를 얻었다. 상기 실시예 (1-1)에서 제조한 pTV2 ST를 주형으로 하여 서열번호 8 및 서열번호 7의 프라이머로 PCR 증폭한 후 위에서 얻은 벡터와 결합을 통해 pTV2 gDsE2를 제작하였다.
- <114> (1-6) pTV2 gDs Δ SN2의 제작

1000068496

> 상기 실시예 (1-4-1)에서 제조한 pTV2 gDs를 AscI과 XbaI으로 절단하여 4.89kb의 벡터를 얻었다. 상기 실시예 (1-3-2)에서 제조한 pTZ HCV를 주형으로 하여 서열번호 9 및 서열번호 10의 프라이머로 PCR 증폭한 후 AscI과 XbaI으로 절단하여 얻은 2.78kb의 삽입체를 위에서 얻은 벡터와 결합시킴으로써 pTV2 gDs ΔSN2를 제작하였다.

16> (1-7) pTV2 SN2의 제작

17> 상기 실시예 (1-6)에서 제조한 pTV2 gDs ΔSN2를 PstI과 NotI으로 절단하여 5.98kb의 벡터를 분리하였다. 상기 실시예 (1-1)에서 제조한 pTV2 ST를 PstI과 NotI으로 절단하여 1.67kb의 삽입체를 분리하여 위에서 분리한 벡터와 결합시킴으로써 pTV2 SN2를 제작하였다.

118> (1-8) pTV2 ΔSN2의 제작

119> pTV2 벡터(Lee, *J. Virol.*, 72, 8430 (1998); Cho, *Vaccine*, 17,1136 (1999))를 PstI과 XbaI으로 절단하여 4.73kb의 벡터를 분리하였다. 상기 실시예 (1-3-2)에서 제조한 pTZ HCV를 주형으로 하여 서열번호 46 및 서열번호 47의 프라이머로 PCR 증폭한 후, PstI과 XbaI으로 절단하여 2.80kb의 삽입체를 분리하여 위에서 분리한 벡터와 결합을 수행하여 pTV2 ΔSN2를 제작하였다.

<120> (1-9) pTV2 SN5의 제작

120> 상기 실시예 (1-1)에서 제조한 pTV2 ST를 NotI과 XbaI으로 절단하여 6.25kb의 벡터를 분리하였다. 상기 실시예 (1-3-2)에서 제조한 pTZ HCV를 NotI과 XbaI으로 절단하여 7.50kb의 삽입체를 분리하여 위에서 분리한 벡터와 결합을 수행하여 pTV2 SN5를 제작하였다.

121> (1-10) pTV2 gDsSTt의 제작

123> pTV2 벡터(Lee, *J. Virol.*, 72, 8430 (1998); Cho, *Vaccine*, 17,1136 (1999))를 PstI과 XbaI으로 절단하여 4.71kb의 벡터를 얻었다. 상기 실시예 (1-4)에서 제조한 pTV2 gDsST를 주형으로 하여 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머로 PCR 증폭한 후, PstI과 XbaI으로 절단하여 얻은 2.40kb의 삽입체를 위에서 얻은 벡터와 결합시킴으로써 pTV2 gDsSTt를 제작하였다.

124> (1-11) pTV2 gDs ΔST의 제작

125> 상기 실시예 (1-4-1)에서 제조한 pTV2 gDs를 AscI과 XbaI으로 절단하여 4.89kb의 벡터를 얻었다. 상기 실시예 (1-1)에서 제조한 pTV2 ST를 주형으로 하여 서열번호 9 및 서열번호 7의 프라이머로 PCR 증폭한 후, AscI과 XbaI으로 절단하여 얻은 2.07kb의 삽입체를 위에서 얻은 벡터와 결합시킴으로써 pTV2 gDs ΔST를 제작하였다.

<126> (1-12) pTV2 gDs ΔSTt의 제작

<127> pTV2 벡터(Lee, *J. Virol.*, 72, 8430 (1998); Cho, *Vaccine*, 17,1136 (1999))를 PstI과 XbaI으로 절단하여 4.71kb의 벡터를 얻었다. 상기 실시예 (1-11)에서 제조한 pTV2 gDs ΔST를 주형으로

1000068496

로 하여 서열번호 11 및 서열번호 12의 프라이머로 PCR 증폭한 후, PstI과 XbaI으로 절단하여 얻은 2.28kb의 삽입체를 위에서 얻은 벡터와 결합시킴으로써 pTV2 gDs Δ STt를 제작하였다.

28> (1-13) pGX10 gDs Δ ST의 제작

29> (1-13-1) pGX10의 제작

30> (1-13-1-1) pTV-3의 제작

31> 벡터 pMT-3 (Sambrook, *Molecular cloning*, 2nd Ed., Vol. 3, 16.20; Kaufman RJ, *Mol. Cell Biol.* 9,946-958, (1989)) 2 g을 HpaI (20 unit) 및 NheI (20 unit)으로 위의 제한 효소처리 법으로 잘라내고 클레노우(Klenow) 단편 (New England Biolabs)(5 unit)과 최종 100 μ M이 되도록 dNTP (Takara)를 넣은 후 25°C 에서 30분 처리하여 평활말단 (blunt end)을 만들었다. 아가로스 겔 전기영동 한 후 0.7kb 단편 (아데노 바이러스 VAI (Viral Antagonist I)전체와 SV40 polyA 일부를 포함)을 벡터 pTV-2 (Lee, 1998 *J Virol.*, 72,8430-36)의 SV40 폴리A 부분의 독특한 Hpa I 부위에 삽입 결합하여 5.3kb의 벡터 pTV-3을 제조하였다.

132> (1-13-1-2) pGX-1의 제작

133> 상기 실시예 (1-13-1-1)에서 제조한 벡터 pTV-3을 주형으로 하여 서열번호 13 및 서열번호 14의 프라이머로 PCR 증폭한 후, PCR 산물 (2.0kb)을 NruI으로 절단하였다. 또한, 벡터 pZero-2 (Invitrogen)을 주형으로 하여 서열번호 15 및 서열번호 16의 프라이머로 PCR 증폭한 후, 그 산물을 SspI으로 절단한 다음 DNA 단편 (1.8kb)을 위의 단편 (2.0kb)과 연결하여 3.8kb의 벡터 pGX-1을 제조하였다:

134> (1-13-1-3) pGX10의 제작

- 36> 상기 실시예 (1-13-1-2)에서 제조한 벡터 pGX-1을 제한효소 XbaI 및 SalI으로 자른 후 두 개의 절편 중 큰 크기 (3.1kb)의 DNA를 상기 DNA 절편의 결합 및 대장균의 형질전환 방법에서와 같이 분리하였다. 벡터 pGL3-인핸서 (Promega)를 제한효소 XbaI 및 SalI으로 잘라서 생성되는 두 개의 절편 중 작은 절편 (0.5kb)을 위와 같은 방법으로 분리하였다. 두 분리된 절편을 결합하여 벡터 pGX10을 얻었다.
- 36> (1-13-2) pGX10 gDs Δ ST의 제작
- 37> 상기 실시예 (1-13-1)에서 제조한 pGX10을 PstI과 XbaI으로 절단하여 3.4kb의 벡터를 얻었다. 상기 실시예 (1-11)에서 제조한 pTV2 gDs Δ ST를 PstI과 XbaI으로 절단하여 얻은 2.22kb의 삽입체를 위에서 얻은 벡터와 결합시킴으로써 서열번호 50의 염기서열(gDs Δ ST)을 포함하는 pGX10 gDs Δ ST를 제작하였다. 상기 플라스미드는 한국 미생물 보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms)에 2002년 8월 29일자로 기탁되었다 (수탁번호: KCCM 10415).
- 138> (1-14) pGX10 NS34의 제작
- 139> 상기 실시예 (1-13)에서 제조한 pGX10 gDs Δ ST를 AscI과 XbaI으로 절단하여 3.56kb의 벡터를 얻었다. 상기 실시예 (1-3-2)에서 제조한 pTZ HCV를 주형으로 하여 서열번호 17 및 서열번호 18의 프라이머로 PCR 증폭한 후, PstI과 XbaI으로 절단하여 얻은 2.82kb의 삽입체를 위에서 얻은 벡터와 결합시킴으로써, 서열번호 51의 염기서열(NS34)을 포함하는 pGX10 NS34를 제작하였다. 상기 플라스미드는 한국 미생물 보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms)에 2002년 8월 29일자로 기탁되었다 (수탁번호: KCCM 10417).

15 006846

15 (1-15) pGX10 NS5의 제작

- 13> 상기 실시예 (1-13-1)에서 제조한 pGX10을 Asp718과 XbaI으로 절단하여 3.4kb의 벡터를
 : 실시예 (1-3-2)에서 제조한 pTZ HCV를 주형으로 하여 서열번호 19 및 서열번호
 :로 PCR 증폭한 후 Asp718과 XbaI으로 절단하여 얻은 3.12kb의 삽입체를 위에서
 : 결합시킴으로써, 서열번호 52의 염기서열(NS5)을 포함하는 pGX10 NS5를 제작하였
 : 라스미드는 한국 미생물 보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms)에
 : 29일자로 기탁되었다 (수탁번호: KCCM 10416).

142> (1-16) pGX10 hIL-12^m (pGX10-hp35/IRES/hp40-N222L)의 제작

143> (1-16-1) pSK-hp35와 pSK-hp40의 제작

- 144> PMA (phorbol myristic acetate)에 의해 활성화된 사람 B 세포인 NC37 세포 (American Type
 Culture Collection; ATCC)로부터 RT-PCR(역전사효소-중합효소 연쇄 반응) (PCR System 2400,
 Perkin Elmer사) 방법을 이용하여 820 bp인 사람 p35 소단위체와 1050 bp인 p40 소단위체의
 cDNA를 클로닝하고, 820 bp인 사람 p35 소단위체는 서열번호 21 및 서열번호 22의 프라이머를,
 1050 bp인 p40 소단위체는 서열번호 23 및 서열번호 24의 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하였
 다.

- <145> 증폭된 cDNA를 각각 출발벡터인 pBluescript SK+ (Stratagene)에 삽입 (subcloning)하고, p35
 및 p40 소단위체 유전자 모두 벡터 pBluescriptSK+의 SmaI 부분에 각각 삽입함으로써 pSK-hp35
 (3.8kb)와 pSK-hp40 (4.0kb)을 제조하였다.

<146> (1-16-2) pSK-IRES의 제조

- 7> p35와 p40 소단위체를 코딩하는 유전자를 함께 발현하는 벡터 (bicistronic vector)를 제작하기 위하여, 먼저 EMCV(Encephalomyocarditis virus)의 IRES (Internal Ribosome Entry Site) (포항공대 생명과학과 장승기 교수로부터 분양 받음) 유전자를 서열번호 25 및 서열번호 26의 프라이머를 이용하여 RT-PCR을 통해 얻고, 이를 EcoRV로 절단한 후 벡터 pBluescriptSK+의 EcoRV 제한효소 부위에 삽입하여 벡터 pSK-IRES (3.5kb)를 제조하였다.
- 48> (1-16-3) pSK-hp35/IRES의 제조
- 49> 상기 실시예 (1-16-2)에서 제조한 pSK-IRES를 제한효소 EcoRV로 절단하고 얻은 DNA 절편 (3.5kb)에, 상기 실시예 (1-16-1)에서 제조한 pSK-hp35를 제한효소 SmaI과 NotI으로 절단한 후 T4 DNA 중합효소로 채워 얻어진 hp35 단편 (0.8kb)을 삽입함으로써 pSK-hp35/IRES (4.3kb)를 제조하였다.
- 150> (1-16-4) pSK-hp35/IRES/hp40의 제조
- 151> 상기 실시예 (1-16-1)에서 제조한 pSK-hp40을 NcoI과 NotI으로 절단하여 얻어진 hp40 단편 (1.0kb)을 상기 실시예 (1-16-3)에서 제조한 pSK-hp35/IRES를 동일한 제한효소로 절단한 부위에 삽입함으로써 p35와 p40 소단위체를 코딩하는 유전자를 함께 발현하는 벡터를 제조하였다. 이 벡터를 제한효소 SmaI과 ClaI을 처리한 후 리가제를 이용하여 재봉합시킴으로써 hp35 앞쪽 제한효소 부위를 일부 제거하였고 이렇게 제조된 벡터를 pSK-hp35/IRES/hp40라 명명하였다.
- <152> (1-16-5) pSK-hp40-N222L의 제조
- <153> hp40의 222번째 아미노산인 아스파라긴산을 루신으로 치환하기 위하여 상기 실시예 (1-16-1)에서 제조한 pSK-hp40을 주형으로 하고 서열번호 27 및 서열번호 28의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 이와 유사하게, 서열번호 29 및 서열번호 30의 프라이머를 사용하여 2차

1000068496

PCR을 수행하였다. 이로부터 돌연변이 지점 (mutational point)을 포함하는 공통 부위(common site)를 공유하는 두 개의 PCR 단편들이 형성되었다. 2차 PCR은 상기 단편들의 혼합물을 주형으로 하고 플랭킹 프라이머 (flanking primer)들을 사용하여 수행하였으며, 그 결과로 이들의 융합 단편 (fusion product)이 형성되었고 상기 단편을 제한효소 NcoI과 NotI으로 절단한 후 제한효소 SmaI으로 절단한 벡터 pBluescriptSK+ (Stratagene, 3.0kb)에 삽입함으로써 플라스미드 pSK-hp40-N222L (4.0kb)을 제조하였다.

54> (1-16-6) pSK-hp35/IRES/hp40-N222L의 제조

55> 제한효소 NcoI과 NotI를 이용하여 상기 실시예 (1-16-5)에서 제조한 pSK-hp40-N222L의 hp40-N222L 단편을 상기 실시예 (1-16-4)에서 제조한 pSK-hp35/IRES/hp40의 hp40 단편과 치환시켜 플라스미드 pSK-hp35/IRES/hp40-N222L (5.3kb)을 제조하였다.

156> (1-16-7) pGX10-hp35/IRES/hp40-N222L의 제조

157> 포유동물 세포에서 발현 가능한 벡터로 hp35/IRES/hp40-N222L 단편을 옮기기 위해 상기 실시예 (1-16-6)에서 제조한 pSK-hp35/IRES/hp40-N222L을 주형으로 하여 서열번호 31 및 서열번호 32의 프라이머를 사용하여 벡터를 증폭시켜 hp35/IRES/hp40-N222L 단편을 얻었다. 얻어진 단편에 제한효소 XhoI를 처리한 후 상기 실시예 (1-13-1)에서 제조한 pGX10을 제한효소 XhoI으로 절단한 부위에 삽입함으로써, 서열번호 53의 염기서열(hIL-12^m)을 포함하는 플라스미드 pGX10-hp35/IRES/hp40-N222L (pGX10 hIL-12^m) (5.9kb)을 제조하였다.

<158> <실시예 2> 본 발명에서 사용된 재조합 아데노바이러스의 제조

<159> (2-1) pShuttleCMV gDs ΔST의 제작

1000068496

▷ (2-1-1) pShuttleCMV gDs Δ ST:H77C의 제작

▷ pShuttleCMV (Q biogene 사)를 BglII와 XbaI으로 절단하여 7.5kb의 벡터를 분리하였다.

pCV-H77C (Masayuki, 1998 *Virology* 244: 161-72)를 주형으로 하여 서열번호 33 및 서열번호 34의 프라이머를 사용하여 PCR 증폭한 후 BglII와 XbaI으로 절단하여 2.07kb의 삽입체를 분리하여 위에서 얻어진 벡터와 결합시킴으로써 pShuttleCMV gDs Δ ST:H77C를 제작하였다.

▷ (2-1-2) pShuttleCMV gDs Δ ST의 제작

▷ 상기 실시예 (2-1-1)에서 제조한 pShuttleCMV gDs Δ ST:H77C를 AscI과 XbaI으로 절단하여 7.43kb의 벡터를 분리하였다. 상기 실시예 (1-13-2)에서 제조한 pGX10 gDs Δ ST를 AscI과 XbaI으로 절단하여 2.07kb의 삽입체를 얻은 후 위에서 분리한 벡터와 결합시킴으로써 pShuttleCMV gDs Δ ST를 제작하였다.

164> (2-2) pShuttleCMV gDsNS34의 제작

165> (2-2-1) pGX10 gDsNS34의 제작

166> 상기 실시예 (1-13-2)에서 제조한 pGX10 gDs Δ ST를 AscI과 XbaI으로 절단하여 3.5kb의 벡터를 분리하였다. 상기 실시예 (1-3-2)에서 제조한 pTZ HCV를 주형으로 하여 서열번호 48 및 서열번호 49의 프라이머를 사용하여 PCR 법으로 증폭한 후 AscI과 XbaI으로 절단하여 얻은 2.81kb의 삽입체를 위에서 얻은 벡터와 결합시킴으로써 pGX10 gDsNS34를 제작하였다.

<167> (2-2-2) pShuttleCMV gDsNS34의 제작

<168> 상기 실시예 (2-1-2)에서 제조한 pShuttleCMV gDs Δ ST를 AscI과 XbaI으로 절단하여 7.43kb의 벡터를 분리하였다. 상기 실시예 (2-2-1)에서 제조한 pGX10 gDsNS34를 AscI과 XbaI으로 절단

100068496

하여 얻은 2.81kb의 삽입체를 위에서 얻은 벡터와 결합시킴으로써 pShuttleCMV gDsNS34를 제작하였다.

9> (2-3) pShuttleCMV NS5의 제작

10> pShuttleCMV (Q biogene 사)을 Asp718과 XbaI으로 절단한 후 7.46kb의 벡터를 분리하였다. 상기 실시예 (1-3-2)에서 제조한 pTZ HCV를 주형으로 하여 서열번호 19 및 서열번호 20의 프라이머를 사용하여 PCR법으로 증폭한 후 Asp718과 XbaI으로 절단하여 얻은 3.12kb의 삽입체를 위에서 얻은 벡터와 결합시킴으로써 pShuttleCMV NS5를 제작하였다.

171> (2-4) pGX10 mIL-12^m의 제작

172> (2-4-1) 야생형 마우스 IL-12 발현 벡터의 제작

173> (2-4-1-1) pSK-mp35/IRES/mp40 의 제작

174> 마우스 p40과 p35 소단위체를 코딩하는 유전자를 함께 발현하는 벡터를 제작하기 위하여, 먼저 EMCV의 IRES가 포함되어 있는 상기 실시예 (1-16-2)에서 제조된 pSK-IRES 벡터를 제한효소 *NcoI*과 *BamHI*으로 절단하고 여기에 마우스 IL-12p40 PCR 생성물 (Schoenhaut, *J. Immunol.*, 1999, 148:3433-3440)을 동일한 제한효소로 절단하여 생긴 p40 DNA 절편을 삽입함으로써 pSK-IRES/mp40을 제작하였다. 이어, 마우스 IL-12p35 생성물 (Schoenhaut, *J. Immunol.*, 1992, 148:3433-3440)을 *BamHI*으로 처리하고 T4 DNA 중합효소를 이용하여 말단을 채운 단편을 *ClaI* 및 T4 DNA 중합효소로 처리된 pSK-IRES/mp40에 삽입함으로써, 결과적으로 p35, IRES, p40 유전자가 순서대로 배열된 pSK-mp35/IRES/mp40 플라스미드를 제조하였다.

1000068496

> (2-4-1-2) pCIN-mp35/IRES/mp40 발현 벡터의 제작

> 상기 실시예 (2-4-1-1)의 방법으로 제조한 mp35/IRES/mp40 유전자를 pCI-neo 벡터(Promega사)의 제한효소 *XhoI*과 *NotI* 부분에 삽입함으로써, 포유동물 세포에서 활성형의 IL-12p70을 발현할 수 있는 pCIN-mp35/IRES/mp40 발현 벡터를 얻었다.

7> (2-4-2) pCIN-mp40 발현 벡터의 제작

78> 야생형 마우스 p40 소단위체를 발현하는 플라스미드의 제작을 위해서 상기 실시예 (2-4-1-1)에서 제조한 pSK-mp35/IRES/mp40 벡터를 제한효소 *NcoI*과 *SacI*으로 절단하여 생성된 p40 단편을 동일한 제한효소로 처리된 pGEX-KG 벡터(미국, Clontech사)에 삽입하였다. 이렇게 생성된 pGEX-KG-mp40을 *EcoRI*과 *NotI*을 처리하여 pCI-neo 벡터의 *EcoRI*과 *NotI* 부분에 삽입함으로써 pCIN-mp40 발현 벡터를 얻었다.

179> (2-4-3) pCIN-mp35 발현 벡터의 제작

180> 야생형 p35 소단위체를 발현하는 플라스미드의 제작을 위해서 상기 실시예 (2-4-1-1)에서 제조한 pSK-mp35/IRES/mp40 벡터를 제한효소 *XhoI*, *EcoRI*으로 절단하여 생성된 p35 단편을 동일한 제한효소로 처리된 pCI-neo 벡터의 *XhoI*과 *EcoRI* 제한효소 부분에 삽입함으로써 pCIN-mp35 발현 벡터를 얻었다.

<181> (2-4-4) pCIN-mp40-N220L 발현 벡터의 제작

<182> mp40의 220번째 아미노산인 아스파라긴산을 루신으로 치환하기 위하여 상기 실시예 (2-4-2)에서 제조한 pCIN-mp40을 주형으로 하고, 서열번호 35 및 서열번호 36의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. 이때 상기 돌연변이는 유전자의 식별을 용이하게 하기 위한 Sac I 제한효

10006846

이식부위를 포함하고 있다. 이로써 동물세포에서 발현 가능한 생쥐 IL-12p40 돌연변이 유전자가 포함된 pCIN-mp40-N220L 벡터를 완성하였다.

2. mp35/IRES/mp40-N220L의 제작

p35 소단위체를 코딩하는 유전자를 동시에 발현하면서 DNA 번역화에 사용할 수 제작하기 위하여, 이미 소동물에서 DNA 백신 벡터로 사용된 바 있는 진핵세포 발현 벡터 (Lee, *J. Virol.*, 72:8430-8436, 1998; Cho, *Vaccine*, 17:1136-1144, 1999)를 제한효소 Asp718과 NotI으로 절단하고, 여기에 상기 실시예 (2-4-1-1)에서 제조한 pSK-mp35/IRES/mp40을 동일한 효소로 절단하여 생긴 mp35/IRES/mp40 단편을 삽입함으로써 pTV2-mp35/IRES/mp40 벡터를 완성하였다. 또한, 생쥐 IL-12p40의 Asn-220 돌연변이 유전자를 포함하면서 p35를 동시에 발현시키는 벡터의 제조를 위해서 먼저 pSK-mp35/IRES/mp40 벡터를 NcoI과 NotI으로 절단하고 여기에 pCIN-mp40-N220L을 동일한 효소로 절단하여 생긴 mp40-N220L 단편을 삽입함으로써 pSK-mp35/IRES/mp40-N220L 벡터를 제작하였다. pTV2-mp35/IRES/mp40 벡터를 EcoRV와 NotI으로 절단하여 mp40 단편을 제거한 후 여기에 pSK-mp35/IRES/mp40-N220L을 동일한 효소로 절단하여 생긴 mp40-N220L 단편을 삽입함으로써 pTV2-mp35/IRES/mp40-N220L 벡터를 완성하였다. 상기 벡터는 생명공학연구소 유전자은행에 2000년 2월 29일자로 기탁되었다

(수탁번호 : KCTC 0745BP).

<185> (2-4-6) pGX10 mL-12의 제조

<186> 벡터 pTV2-mp35/IRES/mp40-N220L을 Sac II와 Not I으로 절단하여 생기는 DNA 단편 (2.5kb)을, pGX10를 동일한 두 제한효소로 절단하여 생기는 DNA 절편 (3.4kb)과 결합시킴으로써 벡터 pGX10 mL-12 mutant (5.9kb)을 최종적으로 얻었다.

> (2-5) rAd-gDs Δ ST 재조합 아데노 바이러스의 제조

> 본 발명에 사용된 재조합 아데노 바이러스인 rAd-gDs Δ ST는 pAdEasy(상표명) 벡터 시스템(Q. Biogene사)을 이용하여 제조하였다. 상기 실시예 (2-1)에서 제조한 pShuttleCMV gDs Δ ST를 *PmeI*으로 절단한 후 pAdEasy 벡터와 함께 *E. coli* 균주 BJ5183에 일렉트로포레이션(electroporation) 방법으로 형질전환시키고, 균주내에서의 동형 재조합(homologous recombination) 과정을 통해, 서열번호 50의 염기서열(gDs Δ ST)을 포함하는 rAd gDs Δ ST를 제조하였다. 이렇게 형질 전환된 균주에서 DNA를 추출하여 *PacI* 제한효소로 절단한 후 60 mm 접시에서 배양한 293A 세포(ATCC)를 칼슘 포스페이트 방법으로 형질전환시킨 뒤, 10일 후 형질전환된 세포를 얼림과 녹임 과정을 3회 거친 후 상층액을 분리하여 100 mm 접시에 배양한 293A 세포에 재-형질전환시켰다. 3일마다 동일한 방법으로 바이러스를 배양하여 최종적으로 150 mm 접시 30개의 293A 세포로 늘려가면서 바이러스의 양을 증폭시켰다. 30개의 150 mm 접시에서 키워진 재조합 아데노 바이러스가 형질전환된 293A 세포들을 수집한 후, 제조사(Q. Biogene사)의 지침에 따라 순수한 재조합 아데노 바이러스만을 정제하였다. 이렇게 정제된 바이러스는 TCID₅₀(Tissue Culture Infectious Dose 50) 방법을 이용하여 정량하였으며, 그 결과 약 1×10^{11} pfu의 재조합 아데노 바이러스 rAd gDs Δ ST를 제조하였다. 상기 재조합 아데노 바이러스는 한국 미생물 보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms)에 2002년 8월 29일자로 기탁되었다 (수탁번호: KCCM 10418).

➤ (2-6) rAd- gDsNS34 재조합 아데노 바이러스의 제조

➤ 상기 실시예 (2-2-2)에서 제조한 pShuttleCMV gDsNS34를 이용하여, 상기 실시예 (2-5)의 rAd-gDs Δ ST의 제작방법과 동일한 방법으로, 서열번호 54의 염기서열(gDsNS34)을 포함하는 rAd- gDsNS34를 제작하였다. 상기 재조합 아데노 바이러스는 한국 미생물 보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms)에 2002년 8월 29일자로 기탁되었다 (수탁번호: KCCM 10420).

91> (2-7) rAd- NS5 재조합 아데노 바이러스의 제조

92> 상기 실시예 (2-3)에서 제조한 pShuttleCMV NS5를 이용하여, 상기 실시예 (2-5)의 rAd-gDs Δ ST의 제작방법과 동일한 방법으로, 서열번호 52의 염기서열 (gDsNS34)을 포함하는 rAd- NS5를 제작하였다. 상기 재조합 아데노 바이러스는 한국 미생물 보존센터 (Korean Culture Center of Microorganisms)에 2002년 8월 29일자로 기탁되었다 (수탁번호: KCCM 10419).

193> <실시예 3> HCV DNA 백신 및 재조합 아데노 바이러스 백신에서 코아(core), E2, NS3, NS4 및 NS5 단백질의 발현 확인(도 5 내지 도 8)

194> 본 발명자들은 상기 실시예에서 기재된 방법으로 제조된 여러 종의 DNA 백신 플라스미드 및 재조합 아데노 바이러스 백신에서 HCV 항원인 코아, E2, NS3, NS4 및 NS5 단백질이 발현되는지를 확인하고자 하였다. 먼저 플라스미드의 발현을 확인하기 위해서는 COS-7 세포를 사용하였다. COS-7 세포는 10% FBS (fetal bovine serum)가 포함된 DMEM 배지(Gibco BRL사)를 이

용하여 배양하였다. 60 mm 접시에 5×10^5 세포를 분주하고, 다음날 도 5, 6, 7에 명시된 발현 플라스미드를 각각 10 μ g씩 칼슘 포스페이트 방법으로 형질 전환시킨 후 36시간 후에 세포들을 수확하여 전기영동에 이용하였다. 이 때, 각 플라스미드가 세포내로 유입되는 비율이 다르므로 인해 발생할 수 있는 변수를 제거하기 위해 5 μ g의 루시페라제 (luciferase) 유전자를 함께 섞어 형질 전환시킨 후, 동일한 수준의 루시페라제 활성을 나타내는 세포 용출액 (cell lysate)을 취해 전기 영동에 사용하였다. 재조합 아데노 바이러스의 경우, 293A 세포를 이용하여 발현을 확인하였다. 도 8에서 명시된 재조합 아데노 바이러스를 각각 1×10^6 pfu씩 60 mm 접시에 배양된 5×10^5 의 293A세포에 감염시킨 후 36시간 후에 세포들을 수확하여 전기영동을 실시하였다. 10% SDS-폴리아크릴아미드젤(polyacrylamide gel)에서 전기 영동을 한 후에 면역 블롯팅(immunoblotting)을 실시하였다. E2 단백질을 검출하기 위해서 항-E2 단일 클론 항체 (Lee, 1999 J Virol 73: 11-8)를 이용하였고, N-말단쪽에 40개의 아미노산이 제거된 Δ 코아 단백질을 검출하기 위하여 항-코아 다클론(polyclonal) 항체를 이용하였으며, NS3, NS4, NS5등의 비구조 단백질을 검출하기 위해서는 HCV 환자의 혈청을 사용하였다.

[195] 도 5는 소동물 실험에 사용된 발현 플라스미드에서 E2 단백질의 발현을 보여 주는 결과로써, A는 실험에 사용된 모든 플라스미드의 발현 수위를 비교하기에 적절한 반면, B는 막관통 도메인이 제거됨에 따른 분자량의 차이를 잘 대변해 주고 있다. E2의 분자량은 38 KDa에 해당하나, 소포체 (Endoplasmic Reticulum; ER)와 골지체에서의 당화(glycosylation) 과정으로 인해 65-70KDa에 해당하는 밴드가 검출된다. 전반적인 경향을 볼 때, 플라스미드에 삽입된 삽입체(insert)의 크기가 길어짐에 따라 발현 수위는 감소함을 보이고 있고, pTV2 SN5는 희미하기는 하나 정확한 위치에서 특이적인 밴드를 형성함으로써 발현을 확인할 수 있었다. 또한,

E2의 막관통 도메인을 제거함에 따른 이동 속도의 차이를 보임으로써(B), 해당 영역이 제거됨을 확인할 수 있었다.

> 도 6은 코아(Core)의 발현을 확인함과 동시에 아미노 말단부의 40 아미노산이 제거됨을 보여주는 결과이다. 코아(Core)의 분자량은 21 KDa으로서, gDs가 삽입되면 24 KDa으로 증가하고, 아미노 말단부 40 아미노산이 제거되면 4.5 KDa의 분자량이 감소하게 된다. 전기 영동상에서 코아(Core)의 정확한 이동위치를 파악하기 위해 본 연구실에서 검증된 pTV2 코아(Core)를 사용하였고, 그림에서 보여지는 바와 같이 코아(Core) 항체에 특이적인 발현 산물이 정확한 크기의 밴드로 위치함에 따라 코아(Core)의 발현 및 아미노 말단부의 40 아미노산이 제거되었음을 확인할 수 있었다. 이때, pTV2 gDs Δ ST의 경우 다른 플라스미드에 비해 코아(Core)의 밴드가 약하게 관찰되었으나, 이러한 현상은 코아(Core)의 발현이 낮음을 의미하는 것은 아니다. 그 근거로서 첫 째, 코아(Core)의 아미노 말단부는 항체반응을 유도하는 주 항원부위(major B cell epitope)가 존재하는 것으로 보고 되었다(Sallberg, 1992 *Immunol Lett* 33:27; Kakimi, 1995 *J Gen Virol* 76: 1205; Harase, 1995 *Immunol Cell Biol* 73:346). 즉, 각 플라스미드에 서 코아(Core)가 동일한 수준으로 발현된다 할 지라도 코아(Core)에 대한 항체가 아미노 말단부가 제거된 코아(Core) 단백질과는 잘 결합하지 못하기 때문에, 결과적으로는 야생형과 비교하여 밴드의 진하기가 약해질 수 밖에 없는 것이다. 둘째로는, pTV2-ST, -gDsST, -gDs Δ ST등의 플라스미드는 코아(Core), E1, E2의 순서로 폴리프로틴(polyprotein)이 만들어진 후 숙주 세포 내에 존재하는 프로테아제(host protease)에 의해 각 유전자 산물로 잘려지게 된다. 이러한 과정에서 볼 때, 각 단백질의 발현 수위는 합성 과정에서는 동일할 것이다. 도 5(A)에서는 pTV2 gDsST와 pTV2 gDs Δ ST가 유사한 정도의 E2를 발현하는 것으로 관찰되었고, 이러한 근거들을 바탕으로 pTV2 gDs Δ ST에서 관찰된 코아(Core)의 약한 밴드는 코아(Core)가 낮게 발현

되기 때문이 아니라 항체를 이용한 검출 방법에 있어서 아미노 말단부가 제거된 변이체 코아(Core) 단백질과의 결합 한계성에 기인한 것으로 추론된다.

<197> 도 7은 침팬지 실험에 사용된 플라스미드의 발현을 보여주는 결과이다. pGX10 gDs Δ ST에서는 정확한 이동위치에서 E2 항체에 특이적인 밴드를 관찰할 수 있었고(A), pGX10 NS34의 경우 67 KDa의 NS3 단백질과 27 KDa의 NS4B 단백질을 확인할 수 있었다(B). pGX10 NS5의 경우 일반적으로 비구조 단백질 전체가 발현되는 경우, C형 간염바이러스가 간직하고 있는 프로테아제의 기능으로 인해 49 KDa의 NS5A 단백질과 66 KDa의 NS5B 단백질로 나뉘어 관찰되지만, 상기 플라스미드는 프로테아제가 제공되지 않기 때문에 115 KDa의 단일 단백질로 발현된다(C). 100 KDa에 해당하는 특이적인 밴드가 검출된 것은, 세포내 발현과정에서의 알려지지 않은 가수분해에 의한 산물이라고 추정된다.

<198> 도 8은 재조합 아데노 바이러스의 발현을 보여주는 결과이다. rAd gDs Δ ST(A)와 rAd NS5(C)는 위에서 설명한 도 7의 경우와 동일하게 설명될 수 있다. rAd gDsNS34의 경우(B), 원래의 67 KDa에 해당하는 NS3 단백질대신 gDs가 삽입됨으로 인해 71 KDa으로 증가된 것으로 볼 수 있으나, 또 한편으로는 gDs의 삽입이 ER로의 위치 변화를 유도함으로 인해 후속적인 당화(glycosylation) 과정에 따라 분자량이 더 커졌을 가능성도 있다.

<199> 본 발명에 사용한 모든 플라스미드는 제작을 마친 후, 염기 서열 결정법으로 클로닝에 이용된 연결 부위와 발현 시작 부위를 검증하였다. 또한 구조 단백질 영역의 경우 대부분 E2의 관점에서 발현을 확인하였고, 일부의 경우 코아(Core)의 발현을 확인하였다. E1 단백질의 발현을 확인하는 실험을 실행하였으나, 사용 항체의 민감도 및 정확도가 떨어져서 정확한 밴드를 검출할 수는 없었다. 그러나, 코아(Core)-E1-E2 순서의 발현과정에서, 코아(Core)와 E2의

이러한 결과가 이루어지고 있음을 볼 때, 그 사이에 존재하는 E1의 발현 또한 정확하게 이루어질 것임을 쉽게 추정할 수 있다.

이는 본 발명에 사용한 플라스미드 및 재조합 아데노 바이러스의 발현을 동물 세포를 통해 확인함으로써, 각 구조물들이 생체내로 유입되었을 때 목적한 유전자 산출할 수 있음을 보여주고 있다.

01> <실시예 4> HCV DNA 백신 및 아데노 바이러스 백신을 이용한 마우스의 면역화

02> 본 발명자들은 위에서 언급한 플라스미드를 100 μ l의 PBS에 용해시킨 후 이를 소동물 면역화를 위한 DNA 백신으로 사용하였다. 각 그룹 당 6마리의 마우스에 뒷다리 정강이 근육으로 50 μ l씩, 총 100 μ l의 DNA 백신을 양쪽 다리에 1차 투여한 후, 경우에 따라 4주 후에 2차 근육 주사를 하였다. 항원 조작을 통한 면역원성의 향상 실시예(도9 내지 도12)에서는 100 μ g의 DNA를 사용하였고, 도13과 14의 경우는 플라스미드 pGX10 gDs Δ ST 40 μ g과 pGX10 mIL-12 변이체 (mutant) 10 μ g을 혼합한 총 50 μ g의 DNA를 면역화에 사용하였다. rAd gDs Δ ST는 5×10^7 pfu를 생리 식염수에 녹여서 이를 재조합 아데노 바이러스(rAd) 백신으로 이용하였다. 면역화한 후 유도된 세포성 면역 반응을 조사하기 위해서, 각 실시예에서 언급한 시기에 비장 세포를 채취하여 실험에 사용하였다. 대조군으로는 생리 식염수만이 주입된 군을 사용하였다.

<203> <실시예 5> 생쥐에서의 IFN- γ ELISPOT 분석

<204> 2-3마리의 면역화한 마우스에서 얻은 비장 세포를 혼합하여 IFN- γ ELISPOT 분석을 제조업자의 지침에 따라 수행하였다. 본 실시예에서는 IFN- γ ELISPOT 키트(Cat# M34201-H, MABTECH사)를 사용하여, IFN- γ 에 대한 코팅용 항체(1-D1K)를 PBS로 5 μ g/ml의 농도로 희석한 후 50 μ l를 96 웰 플레이트 (Millipore, 0.45m, Cat# MAHAS4510, Bedford, MA)에 분주하여 12시간 이상 상온에서 방치하였다. 남아 있는 항체 용액을 흡입(suction)으로 제거한 후, PBS로 2회 씻어주고 나서 동물세포용 배지 (50 units/ml 페니실린, 50 μ g/ml 스트렙토마이신, 50 μ M β -머캅토에탄올, 2mM L-글루타민, 1mM 소듐 파이루베이트, 20 Units/ml 재조합 mIL-2와 10% FBS (standard fetal bovine serum, HyClone, Lot. #AJH10775)를 함유하는 RPMI-1640) 200 μ l를 각 웰에 넣었다. 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 이상을 방치한 뒤 흡입(suction)으로 제거한 후, 위에서 분리한 비장 세포를 1×10^6 과 3.3×10^5 , 그리고 1.1×10^5 세포/웰의 농도로 첨가하였다. 여기에 CD8+ T 세포에 의한 HCV 항원 특이적인 면역 반응을 관찰하기 위해, H-2d MHC 클래스 I을 발현 하면서 C형 간염바이러스의 E2 단백질을 안정적으로 발현하는 CT26-hghE2t 세포주(Song, *J. Virol.*, 74:2920-2925, 2000)를 2×10^4 세포/웰의 농도로 첨가하였다. 이렇게 처리한 96 웰 플레이트를 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 세포 배양기에서 움직임 없이 20시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 96 웰 플레이트의 내용물을 쏟듯이 털어 버린 후, 0.1%의 트윈 20 (Sigma, Cat# D8654)이 함유된 PBS (Gibco BRL) 세척 용액(PBS-T, 0.1%)으로 4회 세척하였다. 바이오틴-결합된 mAb (7-B6-1 biotin)를 세척 용액에 1% BSA를 첨가하여 만든 블록킹 버퍼로 1 μ g/ml 농도가 되게 희석하여 50 μ l씩 웰에 첨가한 후 2시간 동안 반응시켰다. 세척 용액(PBS-T, 0.1%)으로 4회 세척한 후 다시 블록킹 버퍼로 100분의 1로 희석된 스트렙타비딘-HRP 용액을 채워주고 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 AEC 기질 용액을 사용하여 발색을 유도하였고, 스폿(spot)이 적

당한 크기로 보일 때(5-10분) 수돗물을 사용해서 발색 반응을 중단시켰다. 상온에서 96 웰 플레이트를 건조시킨 후 현미경으로 IFN- γ 를 분비하는 세포의 수를 측정하였다.

205> 본 실시예의 ELISPOT 분석에서는 즉석에서 채취한 비장 세포를 사용하거나 (direct ELISPOT), 혹은 1.5×10^7 의 비장 세포를 1×10^6 의 CT26-hghE2t 세포와 함께 위에서 언급한 동물세포 배양 배지에서 5일간 선택적으로 자극시킨 비장 세포를 사용 (expanded ELISPOT)하기도 했다.

206> <실시예 6> HCV E2 특이적인 살상세포(cytotoxic T lymphocyte) 면역반응 조사

207> DNA 및 재조합 아데노 바이러스 백신 처리 후에 각 그룹에서 2-3마리씩의 마우스들로부터 얻어진 비장세포를 이용하여 살상세포 반응을 조사하였다. HCV E2에 특이적인 살상세포를 자극시키기 위해 E2가 발현되고 있는 CT26-hghE2t 세포주(H-2d restricted)를 마이토마이신-C로 30분 간 처리한 후에 반응에 사용하였다. 각 그룹에 해당하는 마우스들의 비장으로부터 비장세포를 얻은 뒤에 약 1.5×10^7 비장세포와 10^6 개의 CT26hGHE2t 세포들을 세포배양액 (RPMI-1640 배지 + 10% FBS + 2 mM 글루타민 + 20 μ M β -머캅토에탄올 + 20 U/ml의 mIL-2)으로 혼합한 후 약 5일간 37°C CO₂ 배양기에서 반응시켰다. 표적 세포로 이용되는 CT26-hghE2t 세포는 웰(well) 당 10^4 세포씩 분주하였고, 1 μ Ci의 ⁵¹Cr을 2시간동안 처리하였다. 세포배양액으로 3번 세척해 준 뒤에, 5일간 자극된 비장세포를 작용(effector) 세포로

반응에 사용하였다. 작용 세포와 표적 세포를 도에서 표기하는 세가지의 서로 다른 비율로 혼합한 후 5시간 동안 반응시켰다. 상기 배양액으로부터 상층액을 회수하여 방출된 ^{51}Cr 의 양을 방사능 측정기로 측정함으로써 살상세포 세포의 활성 정도를 조사하였다. 이때, 대조군으로는 표적 세포에 작용세포를 첨가하지 않은 상태에서 배지만을 첨가하여 자연적 ^{51}Cr 방출 (spontaneous release)을 측정하기 위한 음성 대조군 (negative control)과, 2% 트윈 용액을 첨가하여 표적 세포내에 존재하는 모든 ^{51}Cr 의 방출(maximum release)을 유도하는 양성 대조군 (positive control)으로 사용하였다. 살상세포 세포의 활성을 계산하는 방법은 아래와 같다.

<208> % 특이적 세포용해(% Specific Lysis) = $(R_{\text{Max}} - R_{\text{eff}}) / (R_{\text{Max}} - R_{\text{spon}}) \times 100$

<209> R_{Max} : 최대 방출 (Maximum Release)

<210> R_{eff} : 작용세포 방출(Effector Release; 작용세포를 첨가했을 때 나타난 수치)

<211> R_{spon} : 자연적 방출 (Spontaneous Release)

<212> <실시예 7> DNA 백신의 항원 조작을 통한 면역원성 향상-1.

<213> (도 9, 도 10: 발현 벡터내의 삽입체 크기가 세포성 면역반응의 유도에 미치는 영향)

<214> 본 실시예에서는 C형 간염 바이러스에 대한 DNA 백신의 효능 측면에 있어서, 하나의 DNA 벡터내에 어느 정도의 삽입체(insert) 길이를 포함하는 것이 세포성 면역 반응을 유도하는데 적절할 것인지를 조사하고자 했다.

<215> 실시예에 사용된 비교 대상 플라스미드는, E2만을 단독으로 발현하는 플라스미드에서 시작하여, E2를 포함하면서 다른 영역을 포함하여 그 길이를 증가시킨 기타 다른 플라스미드를 사용하였다. E2의 발현은 E1에 연이어 해독이 되는데, 이때 E1의 막관통 도메인이 E2가

ER(Endoplasmic Reticulum)로 이동하게 하는 신호 서열(signal sequence)로 작용함으로써, 결국 E2는 ER로 위치하게 된다. 따라서, E2만을 단독으로 발현하는 플라스미드의 경우, 세포내 위치를 ER로 국한시키기 위해 HSV의 gDs를 E2의 아미노 말단부에 삽입하였다. 상기 플라스미드를 최소단위의 대조 벡터로 설정한 후 아래와 같은 서로 다른 길이를 포함하는 세가지 범주의 플라스미드들을 비교, 조사하였다. 첫째, 야생형의 코아(Core)가 세포질에서 발현하면서 다른 유전자도 포함하는 플라스미드로서, 코아(Core)에서 E2까지 발현하는 pTV2-ST, 코아(Core)에서 NS2까지 발현하는 pTV2-SN2, 그리고 코아(Core)에서 NS5까지 HCV 전체 유전자를 발현하는 pTV2-SN5를 사용하였다. 두번째 범주로는, 아미노 말단부의 40 아미노산이 결손된 코아(Δ Core)가 세포질에서 발현되는 플라스미드로서, pTV2- Δ ST, - Δ SN2를 사용하였고, 마지막으로 Δ 코아(Δ Core)가 ER에서 발현되는 플라스미드로서, pTV2-gDs Δ ST, -gDs Δ SN2를 사용하였다. 상기의 플라스미드 100 μ g씩을 면역화한 후 5주 후 또는 재 면역화 후 3.4주 후에, Th1 면역 반응의 작용 세포로 알려진 CD8+ T 세포 반응을 조사하였다. E2에 대한 IFN- γ ELISPOT 분석 또는 살상세포 반응을 조사하는 데 있어서 자극원으로 사용한 것은 CT26-hghE2t 세포주로서, MHC 클래스II는 발현하지 않으면서 MHC 클래스 I만 발현하기 때문에, 결국 CD8+ T 세포만 선별적으로 자극함으로써 원하는 반응을 관찰할 수 있다. 이러한 접근 방법은 본 연구실에서 CT26-hghE2t 세포주를 이용하여 5일간 자극시킨 후 살상세포 반응과 IFN- γ ELISPOT 반응을 조사했을 때, 이 두 가지 결과가 일치함을 보임으로써 실험적 타당성을 보였다.

<216> 1차 면역화한 후 5주 후에 세포성 면역 반응을 관찰한 결과(도 9), 야생형 코아(Core)가 세포질에서 발현되는 경우, IFN- γ ELISPOT 반응 측면에서는 pTV2 gDsE2를 기준으로 환산했을 때 pTV2 ST는 47%, pTV2 SN2는 23%, 그리고 pTV2 SN5는 3%에 해당하는 값과($p < 0.0001$), 살상

세포 반응에서는 30 E/T 비율에서 각각 84%, 50%, 18%, 그리고 2%에 해당하는 값을 보임으로써, 삽입체(insert)의 길이에 비례하여 순차적으로 감소하는 세포성 면역 반응의 형태를 보여 주었다. 반면에 세포질 혹은 ER에서 Δ 코아가 발현되는 플라스미드의 경우, IFN- γ ELISPOT 반응 측면에서는 pTV2 gDsE2에 비해 pTV2 Δ ST는 77%, pTV2 Δ SN2는 31%를, 그리고 pTV2 gDs Δ ST는 84%, pTV2 gDs Δ SN2는 20%의 값을 보임으로써, 코아(Core)에서 E2까지 발현되는 플라스미드는 E2만 단독으로 발현하는 경우에 비해 유사한 정도의 세포성 면역 반응을 보여 주었으나, NS2이상의 영역을 포함하는 플라스미드를 사용했을 때는 급격히 감소함을 알 수 있었다. 이러한 현상은 살상 세포 반응을 관찰 했을 때, 84%를 보이는 pTV2 gDsE2에 비해 pTV2 Δ ST가 79%, pTV2 Δ SN2는 54%를, 그리고 pTV2 gDs Δ ST는 68%, pTV2 gDs Δ SN2는 53%의 값을 보임으로써, 유사성을 띄는 것으로 관찰되었다. 2차 면역화 한 후 3.4주 후에 세포성 면역 반응을 조사했을 때, IFN- γ ELISPOT 반응 측면에서 pTV2 gDsE2에 비해 pTV2 ST는 150%, pTV2 SN2는 26%, 그리고 pTV2 SN5는 50%에 해당하는 값을 보였고, pTV2 Δ ST는 144%, pTV2 Δ SN2는 35%를, 그리고 pTV2 gDs Δ ST는 104%, pTV2 gDs Δ SN2는 26%의 값을 보임으로써, 코아(Core)에서 E2까지를 포함하는 DNA 백신의 면역원성이 E2 단독인 경우와 비슷하거나 우월한 양상을 보였다(도 10). 이러한 결과는 한 벡터내에서 발현되는 외래 유전자의 길이가 어떠한 이유에 근거하여 세포성 면역 반응의 유도에 영향을 줄 수 있다는 것을, E2에 대한 IFN- γ ELISPOT 분석 및 살상세포 반응을 통해 보여 주고 있다.

<217> 이와 관련하여 생각해 볼 수 있는 것은, 첫째, 유전자 길이의 증가에 따른 상대적인 발현 수위의 감소를 들 수 있다. 도 5의 발현 수위를 비교한 결과를 보면 일반적으로 길이가 증가함에 따라 발현 수위가 떨어짐을 관찰할 수 있다. 따라서, 발현 수위가 세포성 면역 반응에

여향을 준다고 예상할 수 있다. 하지만, 본 발명자들이 후속 실험을 통해 조사한 바로는, 같은 항원 간직하면서 발현수위가 50배 이상의 차이가 나는 3가지의 서로 다른 벡터를 이용해서 세포성 면역반응의 유도에 별 차이를 보이지 않음을 관찰할 수 있었다. 이는 항원의 차이가 위 현상의 주된 요인이 될 수 없음을 시사하고 있는 것이다. 둘째로는, 원성이 더 뛰어난 항원이 동시에 발현되는 경우, 면역 반응 유도에 따른 항원간의 (genetic interference)으로 인해 E2에 대한 면역 반응은 상대적으로 감소하게 될 것 이라는 유추는 세포성 면역 반응의 유도에 있어서, 비구조 단백질 영역이 구조 단백질 보다 우수함을 보이는 이전의 보고들에 의해 설득력을 갖는다. 그러나, 본 발명자들이 행 한 후속 실험의 결과를 보면, pTV2-SN5와 같은 종류의 항원을 발현하도록 부가적인 발현 플라스미드를 섞어서 면역화 했을 때도 E2에 대한 세포성 면역 반응의 감소를 관찰할 수 없었다. 즉, 면역원성이 강할 것이라고 예상한 비구조 단백질 항원의 동시 발현이 E2에 대한 세포성 면역 반응을 감소시키지 않는다는 것이다. 일반적으로 추측해 볼 수 있는 것은, 합성되는 폴리 단백질(polyprotein)의 길이에 따른 차이가 항원이 세포내에서 발현되는 과정에서 항원 제시에 관련된 어떠한 과정에 영향을 줄 수 있다는 것이다. 이러한 일련의 고찰은 한 DNA 벡터 내에서 발현되는 외래 유전자의 길이에 따라 세포성 면역 반응이 다른 정도로 유도된다는 사실에 대해, 그 메커니즘을 밝히기 위한 후속 연구가 필요함을 시사하고 있다.

<218> <실시예 8> DNA 백신의 항원 조작을 통한 면역원성 향상-2.

<219> (도 11: 코아(Core)의 N 말단 40 아미노산의 제거가 E2에 대한 세포성 면역반응의 유도에 미치는 영향)

220> 본 실시예에서는 C형 간염 바이러스에 대한 DNA 백신의 효능 측면에 있어서, 코아(Core)의 면역 저해 효과를 재고찰함과 동시에 관찰된 코아(Core)의 면역 저해 효과를 피해 나가는 방법을 제시하고자 했다. 본 연구실에서는 코아(Core)를 안정적으로 발현하는 항원 제시세포를 사용했을 때 코아(Core)의 면역 저해 효과가 나타난다는 결과를 발표했고(Lee, *Virology*, 2001, 279:271), 이러한 저해 효과를 소거할 수 있는 변이체(deletion mutant)를 조사하는 후속 연구 과정에서, 아미노 말단부 40 아미노산이 제거된 코아(Core)의 경우 면역 저해 효과가 사라짐을 확인할 수 있었다. 본 실시예의 전략은 이러한 예비 실험 결과를 토대로 구상되었다.

221> 세포질에서 코아(Core)를 발현하면서 동시에 리포터(reporter) 항원인 E2를 발현하는 pTV2-ST, pTV2-SN2 플라스미드를 사용하여 E2에 대한 세포성 면역 반응을 조사하였고, 이와 더불어 동일한 영역을 발현하면서 코아(Core)의 N 말단 40 아미노산이 제거된 pTV2-ΔST와 pTV2-ΔSN2 플라스미드를 사용하여 세포성 면역 반응의 차이를 조사하였다. 해당 플라스미드를 100 μg씩 1회 면역화한 후 5주 후에, CT26-hghE2t 세포주를 자극 세포로 사용하여 E2에 대한 CD8+ T 세포성 면역 반응을 IFN-γ ELISPOT 분석과 살상세포 반응을 통해 관찰하였다.

222> 도 11에서 보여지는 바와 같이, 코아(Core)가 온전히 발현되는 경우와 아미노 말단부의 40 아미노산이 결손된 경우와는 E2에 대한 세포성 면역 반응에 있어서 차이를 보이고 있다. pTV2-ΔST와 pTV2-ΔSN2의 경우 직접(direct) ELISPOT에서 pTV2-ST와 pTV2-SN2에 비해 각각 163%(p<0.01)와 134%(p<0.1)만큼의 증가된 반응을 보이고 있고, 이러한 차이는 5일간의 자극을 거친 후 조사한 증폭후 ELISPOT(expanded ELISPOT) 결과에서 각각 347%(p<0.003)와 800%(p<0.001)만큼의 극적인 증가를 보였다. 또한 살상세포 반응에서는 30의 E/T 비율에서

pTV2-ST와 pTV2-SN2가 50%와 18%의 활성을 보인 반면, pTV2- Δ ST와 pTV2- Δ SN2의 경우 79%와 54%의 활성을 보임으로써 ELISPOT 결과를 재확인 할 수 있었다. 그럼에도 불구하고 상기 플라스미드가 유도하는 세포성 면역 반응의 차이가 직접 ELISPOT 결과에서는 통계적인 확신을 갖기에는 그리 크지 않다는 이유로 인해 3회의 독립적인 반복 실험을 진행하였고, 그 결과 매 실시마다 같은 정도의 차이를 나타내는 반복적인 결과를 재현할 수 있었다.

223> 기존의 코아(Core)에 대한 면역 저해 효과에 대해서는 상반된 보고들이 존재한다(Liu, 2002 *J Virol* 76:990; Soguero, 2002 *J Virol* 76: 9345). 그만큼 코아(Core)의 효과가 논쟁의 여지를 남길 정도로 미미하거나, 또는 선별적인 실험 조건에서만 관찰될 수 있음을 암시하기도 한다. 본 실시예에서는 직접 ELISPOT에서 비록 극적인 차이는 아니지만 코아(Core)에 의한 면역 저해 효과를 보였고, 5일간의 자극 기간을 거친 후의 IFN- γ ELISPOT 분석에서 보다 증폭된 효과를 관찰할 수 있었다. 일반적으로 5일간의 자극은 작용세포(effector T cell)가 분열을 통해 사라지고 본래 존재하는 기억 세포(memory T cell)의 활성을 대변한다고 한다(Liu, 1997 *J Exp Med* 185:251; Susan, 2002 *Nat Rev* 2:251). 그렇다면 코아(Core)의 면역 저해 효과는 작용세포 시기보다는 기억 세포 시기에 보다 더 큰 효과를 보인다고 생각할 수 있다. 그러나, 실험 조건에 따른 작용 세포나 기억 세포의 활성에 대한 정의가 DNA 백신 모델에서 적용될 수 있는지에 대해 검증되지 않은 상황에서, 본 결과의 의미를 어떻게 해석할 수 있을지는 후속 연구가 뒤따라야 할 것이다. 또한 본 발명팀에 의한 후속 연구에서, 2차나 3차 면역화 후 같은 플라스미드를 이용하여 코아(Core)의 효과를 조사했을 때, 세포성 면역 반응의 차이가 감소하거나

사라짐을 관찰 할 수 있었다. 즉, 코아(Core)의 효과는 그 차이가 미미할 뿐 아니라 일시적인 것일 수 있음을 암시하는 것이다. HCV 환자의 초기 감염시기에 HCV 항원에 특이적인 T 세포의 특징을 조사한 최근의 보고에서, 분열은 진행되지만 IFN- γ 를 분비하는 능력이 상실(stunned phenotype) 되어 있는 시기가 존재하고 이러한 형질은 감염시기가 지나면서 IFN- γ 를 분비하는 형태로 전환된다는 사실이 발표되었는데(Lechner, 2000 *J Exp Med* 191:1499), 본 실시예의 결과와 함께 코아(Core)가 이러한 일시적인 억제 효과를 담당한다고 생각해 볼 수 있다.

<224> 본 실시예의 결과는 세포질에서 발현되는 코아(Core)가 면역 저해 기능을 갖고 있음을 보여 주며, 동시에 아미노 말단부의 40 아미노산이 결손된 경우 코아(Core)의 면역 저해가 사라짐을 보여 주고 있다. 즉, 아미노산 보존성이 가장 높은 코아(Core)를 백신으로 사용하면서도 코아(Core)가 갖고 있는 면역 저해 효과를 소거하여, 결과적으로는 HCV에 대한 세포성 면역 반응을 증가시키는 방법을 제시하고 있는 것이다.

<225> <실시예 9> DNA 백신의 항원 조작을 통한 면역원성 향상-3.

<226> (도 12: E2의 막관통 도메인의 존재 유무에 따라 유도되는 세포성 면역반응의 차이)

<227> 본 실시예에서는 E2의 면역원성 측면에서 막관통 도메인의 존재 여부에 따라 E2에 대한 세포성 면역 반응의 정도가 어떻게 달라지는지를 조사하고자 했다.

<228> 상기 목적을 위해 E2만을 단독으로 발현하는 플라스미드인 pTV2 gDsE2와 Δ

코아(Δ Core)-E1-E2를 발현하는 pTV2 gDs Δ ST를 사용하였고, 이에 대한 대조군으로서 E2의 막관통 도메인이 제거된 pTV2 gDsE2t와 pTV2 gDs Δ STt를 사용하였다. 상기 플라스미드를 각각 100 μ g씩 1회 면역화한 후 5주 시점에서, 또는 2회 면역화한 후 3.4주 시점에서 E2에 대한 세포성 면역 반응을 IFN- γ ELISPOT 측면에서 관찰하였다. 이때 1차 면역화 후에는 CT26-hghE2t 세포주를 사용하여 자극을 주었고, 2차 면역화 후에는 E2에 대한 펩타이드 혼합물(peptide pool)로 자극을 주었다. 전자가 CD8+ T 세포만을 자극하는 반면, 후자는 CD8+ T 세포뿐 아니라 CD4+ T 세포도 자극할 수 있는 조건이다.

229> 도 12를 살펴 보면, pTV2 gDsE2와 pTV2 gDs Δ ST의 경우를 기준으로 볼 때, 1차 면역화 후 5주 시점에서는 pTV2 gDsE2t와 pTV2 gDs Δ STt가 각각 66% ($p < 0.001$)와 50% ($p < 0.001$)에 해당하는 값을 보였고, 2차 면역화 후 3.4주 시점에서는 각각 40% ($p < 0.005$)와 39% ($p < 0.004$)의 수치를 보였다. 이러한 결과는, E2 단독으로 발현되는 경우 뿐 아니라 구조 단백질 전체가 함께 발현되는 경우에도, E2의 막관통 도메인을 제거했을 때 E2에 대한 세포성 면역 반응이 감소한다는 사실을 보여주고 있다.

230> 방법적인 측면에서 볼 때, E2의 막관통 도메인에 T 세포 에피토프가 존재한다면 위와 같은 현상이 나타날 수 있을 것이다. 그러나, 본 실시예에서는 이러한 가능성을 배제하기 위해, 막관통 도메인이 제거된 형태의 E2를 발현하는 세포주를 사용하였고(CT26-hghE2t cell line), E2에 대한 펩타이드 혼합물도 막관통 도메인을 제외하고 제작되었다. 따라서, 본 결과는 막관통 도메인에 존재할 가능성이 있는 에피토프와는 무관하게 관찰된 결과라고 할 수 있다. 이 현상에 대한 메커니즘으로서 다음과 같은 가능성을 생각해 볼 수 있다. 첫째, 막관통 도메인이 제거되면 세포 외로의 분비를 유도하게 된다. 이론적으로 비교해 보았을 때, E2 단백질이

세포 내에 존재하는 시간은 막관통 도메인이 제거됨에 따라 더 짧아지게 되는 것이다. 항원 제시과정은 단백질이 합성되는 과정에서 일부가 프로테아좀 (proteasome)에 의해 적당히 잘려지면서 ER을 통해 MHC 클래스 I 분자와 결합하게 되고, 이어서 분비 체계를 이용하여 세포 표면으로 표출된다. 그러나, 항원 제시 세포중 수상 돌기 세포(Dendritic Cell)의 경우, 교차 제시(Cross presentation)이라는 과정을 통해 엔도솜(endosome)에 있는 단백질이 ER에 있는 MHC 클래스 I 분자와 결합하여 CD8+ T 세포를 자극할 수 있다(Heath, 2001 *Nat Rev Immunol* 1:126). 이러한 현상은, 합성이 끝난 후의 단백질이라도 항원 제시 과정에 참여할 수 있음을 암시하고 있다. 따라서, 세포의 분비를 유도함으로써 항체 반응을 더 효율적으로 유도한다는 장점은, 세포내에 존재하는 시간이 짧아짐으로 인해 세포성 면역반응의 유도 측면에서는 단점이 될 수 있을 것이다. 또 생각해 볼 수 있는 가능성으로는, 막관통 도메인의 존재 여부에 따른 단백질 구조상의 차이가, 항원 제시과정에 관여하는 많은 단계에 변화를 야기할 수 있다는 점이다. 막 단백질은 안정적인 구조를 유지하기 위해서는 지질 막 성분이 필요하다. 이러한 차이는 물리화학적인 단백질의 특성으로 설명될 수 있는데, 단백질이 세포질에서 만들어지면서 항원제시 과정에 참여하게 되기까지 이러한 물리화학적 성질의 차이가 결과적인 항원 제시 과정에서의 차이로 나타날 수 있을 것이다.

<231> 본 실시예의 결과는 E2 단백질의 막관통 도메인의 제거가 세포성 면역 반응의 유도에 부정적인 역할을 함을 보임으로써, 막관통 도메인을 간직하는 DNA 백신의 필요성을 입증하는 것이다.

<232> DNA 백신의 항원 조작을 통한 면역원성 향상을 보여주는 일련의 실시예들은, 개별적으로 보았을 때 그 차이가 현격한 것은 아니지만, 상기의 모든 요소들이 한 질병모델에서 종합적으

로 작용할 때, 그 효과가 가중적(cumulative effect)이 될지, 혹은 시너지 효과(synergistic effect)를 나타낼 지는 더 연구가 필요할 것이다. 특히 HIV나 HCV와 같이 다양한 변이체(variants)가 빠른 속도로 생산되는 병원균의 경우, 면역 반응과 바이러스 증식의 균형은 만성 감염으로의 진행에 중요한 요소로 작용하고 있다. 따라서, 상기 실시예는 항체와 어떻게 세포성 면역 반응을 올릴 수 있는가에 대한 새로운 접근법을 HCV에 대항하여 적용할 수 있는 모델을 통해 제시하고 있다.

233> 실시예 10> HCV E2와 코아 단백질에 특이적으로 반응하여 IFN- γ 와 IL-4를 분비하는 CD4⁺ T 세포의 정량 (도 13)

234> 본 실시예에서는 어떠한 백신 투여 방법을 사용하여 면역화 하는 것이 HCV에 대한 방어 면역인 Th 1 면역 반응을 최대화 할 수 있는지를 탐색한 것이다. 본 발명자들은 각 그룹당 4마리 마우스들의 비장을 분리한 후에 5×10^7 비장세포를 450 μ l MACS 완충용액(0.5% BSA, 2 mM EDTA in PBS)에 재부유시키고 50 μ l MACS 항체 비드(bead)와 혼합한 후 4°C에서 15분동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 5 ml의 MACS 완충용액으로 2번 세척한 후에 샘플을 500 μ l MACS 완충용액에 재부유시켰다. 500 μ l MACS 완충용액으로 MACS 미니-칼럼을 평형화(equilibration)시킨 후 자기장에 노출시켰고, 상기 칼럼에 샘플을 로딩(loading)하였다. 완충용액이 다 흘러나온 후 칼럼을 MACS 완충용액으로 3번 세척하였고, 칼럼에 자기장을 제거한 후 500 μ l MACS 완충용액으로 용출하였다. 최종적으로 얻어진 이들 세포들에 대하여 FACS 분석을 수행하였으며, 이로부터 약 90%의 세포가 CD4⁺ T 세포임을 확인하였다. 이들 세포들은 이후 IFN- γ 와 IL-4를 분비하는 세포수를 정량적으로 확인할 수 있는 ELISPOT 분석에 이용하였다.

35> 그 결과, HCV E2 및 코아 단백질 항원 모두에 대해 DNA 프라이밍-rAd 부스팅 방법이 다른 백신방법에 비해 가장 높은 수치의 IFN- γ 를 생산하는 CD4+ T 세포를 보여주었다(도 13의 A 및 도 13의 B, G2, $p < 0.001$). DNA만을 두 번 처리한 경우, E2에 대해서는 특이적인 IFN- γ 를 생산하는 CD4+ T 세포가 거의 생성되지 않은 반면(도 13의 A, G1), 코아 단백질에 대해서는 rAd를 두 번 처리한 그룹과 비슷한 정도로 IFN- γ 를 생산하는 CD4+ T 세포의 생성을 유도하였다(도 13의 B, G1). 이는 코아 단백질 항원자체가 E2와는 달리 DNA 백신처리만으로도 효과적으로 CD4+ T 세포의 면역을 유도를 하기 때문인 것으로 생각된다. 대조적으로, IL-4 ELISPOT를 수행하였을 때는 모든 그룹에서 코아 및 E2 단백질에 특이적으로 반응하여 IL-4를 합성하는 CD4+ T 세포는 거의 검출되지 않았는데(도 13의 C 및 도 13의 D), 이는 전반적으로 DNA 백신과 아데노 바이러스 백신이 Th2 보다는 Th1 CD4+ T 세포의 면역반응을 유도하기 때문인 것으로 생각된다. 상기 결과로부터, 본 발명자들은 아데노 바이러스를 두 번 주입하거나, rAd 프라이밍-DNA 부스팅 방법보다 DNA 프라이밍-rAd 부스팅 방법이 CD4+ Th1 면역반응을 유도하는데 가장 적합하다는 것을 확인하였다.

<236> <실시예 11> HCV E2에 특이적으로 반응하여 나타나는 살상 세포 (cytotoxic T lymphocyte) 면역반응 조사(도 14)

<237> DNA 및 재조합 아데노 바이러스 백신 처리 후에 각 그룹에서 2마리씩의 마우스들로부터 얻어진 비장세포를 이용하여 살상 세포 반응을 조사하였다. HCV E2에 특이적인 살상 세포를 자극시키기 위해 E2가 발현되고 있는 CT26-hghE2t 세포주(H-2d restricted)를 사용하였다.

<238> 그 결과, 아데노 바이러스를 두 번 주입하는 방법과 DNA 프라이밍-rAd 부스팅 방법이 서로 큰 차이 없이 가장 효과적인 것으로 나타났다(도 14, G2 및 G3). rAd 프라이밍-DNA 부스팅

방법과 DNA를 2번 주입하는 방법도 특이적인 살상 세포 반응을 나타내었지만 상기의 두 방법만큼 효과적이지 못하였다(도 14, G1 및 G4). 상기 결과는 살상 세포 반응의 유도에도 DNA 프라이밍-rAd 부스팅 면역 방법이 가장 효율적임을 의미한다.

- 39> <실시에 12> 면역원성 플라스미드 및 재조합 아데노 바이러스를 사용한 침팬지의 면역화 및 감염성 C형 간염 바이러스의 접종(challenge) (도 15)
- 40> 실험에 사용한 침팬지의 기록은 표 1에 자세히 명기되어 있다. 실험군 1은 6mg의 HC102 DNA 백신을, 실험군 2는 8mg의 HC103 DNA 백신을 2mg/ml의 농도로 PBS에 녹인 후, 좌우 삼각근과 좌우 대둔근 4 곳의 부위에 각각 HC102는 0.75ml과 HC103는 1ml씩, 8주 간격으로 3회 근육 주사하였다. 그로부터 30주 후에 1×10^{10} pfu의 재조합 아데노 바이러스 (rAd gDs Δ ST, rAd gDsNS34, rAd NS5)를 1.6ml의 현탁 버퍼 (10mM Tris, 4% sucrose, 2mM MgCl₂. pH 8.0)에 녹인 후, 0.4ml씩 DNA 백신과 같은 4곳 부위의 근육에 주사하였다. 재조합 아데노 바이러스로 마지막 면역화 한지 12주 후에, 100 CID₅₀/ml농도의 HCV-bk 접종(challenging inoculum)을 침팬지 당 1ml씩 우측 대퇴부 정맥(right femoral vein)으로 주사하였다.

【표 1】

백신	침팬지	이름	성별	출생일	모친 (mother)	모친의 HCV 감염	모친의 HCV 감염기간	HBV에 대한 노출	HCV에 대한 노출
대조군	404	Chop Suey	F	94.09.12	Spring Roll	감염 후 회복	96.9부터 96.12	없음	없음
	406	Noli	F	94.11.25	Annie	감염 후 회복	89.8부터 90.2	없음	없음
HC102/ rAd HC102	376	Sabel	F	91.08.25	Mabel	없음		없음	없음
	393	Sally	F	92.11.02	Lucy	없음		없음	없음
	400	Pasiway	M	94.05.09	Pasimani	없음		없음	없음
HC103/ rAd HC103	381	Troy	F	91.10.19	Helen	없음		없음	없음
	397	Root Bear	F	93.12.05	Sarsaparilla	감염 후 회복	88.8부터 88.11	없음	없음
	402	Lawrence	M	94.07.02	Juno	없음		없음	없음

242> <실시예 13> 침팬지에서의 면역 세포의 분리

243> 실험에 사용된 침팬지의 우측 대퇴부 정맥(right femoral vein)에서 10ml용기의 헤파린처리된 진공채혈관 (heparinized vacutainer)으로 혈액을 채취하여, PBMC (peripheral blood mononuclear cell)를 분리한 후 세포성 면역 반응을 조사하는데 사용하였다.

244> 두 개의 진공채혈관 용기에 담겨져 있는 혈액을 RPMI-1640 배지로 희석하여 30ml로 맞춘 후, 15ml의 림프구 분리 배지 (Lymphocyte Separation Medium ; Cellgro Mediatech, Cat# 25-072-CV)가 담겨 있는 50ml 코니칼 튜브에 층을 형성하도록 피펫으로 조심스럽게 옮겼다. 이 혼합액을 1800RPM의 속도로 상온에서 20분간 원심분리기(Eppendorf refrigerated tabletop centrifuge)로 원심 분리한 후, 상층에 존재하는 플라즈마를 제거하고 그 아래의 젓빛층(PBMC layer)을 피펫으로 조심스레 분리하여 새로운 50ml 코니칼 튜브에 옮겨 담았다. RPMI-1640 배지로 희석하여 50ml로 맞춘 후 동일한 조건에서 10분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 동일한 과정을 2회 더 반복함으로써 분리한 PBMC를 깨끗이 씻어준 후, 0.4%의 트리판 블루

(Trypan Blue ; Sigma, Cat# 8154)로 적당히 희석하여 혈구계수기 (hemacytometer)로 세포수를 측정하고 이후의 면역 반응 조사에 사용하였다.

245> <실시예 14> 침팬지에서의 IFN- γ ELISPOT 분석

246> 면역화한 침팬지에서 얻은 PBMC를 사용하여 IFN- γ ELISPOT 분석을 제조업자의 지침에 따라 수행하였다. 본 실시예에서는 IFN- γ ELISPOT 키트(MABTECH사, Cat# M34201-H)를 사용하여, IFN- γ 에 대한 코팅용 항체(1-D1K)를 PBS로 5 μ g/ml의 농도로 희석한 후 50 μ l를 96 웰 플레이트(Millipore, 0.45m, Cat# MAHAS4510, Bedford, MA)에 분주하여 12시간 이상 상온에서 방치하였다. 남아 있는 항체 용액을 흡입(suction)으로 제거한 후, PBS로 2회 씻어주고 나서 동물세포용 배지(50 units/ml 페니실린, 50 μ g/ml 스트렙토마이신, 50 μ M β -머캅토에탄올, 100 M MEM 비필수 아미노산, 2mM L-글루타민, 1mM 소듐 파이루베이트, 10mM HEPES, 20 Units/ml 재조합 hIL-2와 1% ABS (human AB serum, Valley Biomedical, Lot# A20124)를 함유하는 RPMI-1640) 200 μ l를 각 웰에 넣었다. 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 이상을 방치한 뒤 흡입 (suction)으로 제거한 후, 위에서 분리한 PBMC를 3x10⁵ 세포/웰의 농도로 도포하였다. 여기에 HCV 항원 특이적인 세포성 면역 반응을 관찰하기 위해, 항원 특이적 펩타이드 혼합물(peptide pool)을 각 펩타이드당 1 μ g/ml의 농도가 되도록 첨가하였고, 양성 대조군 (positive control)으로는 파 이토헤마글루티닌

(phytohemagglutinin; PHA)을 $2.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 처리하였다. 이렇게 처리한 96 웰 플레이트를 37°C 5% CO_2 세포 배양기에서 움직임 없이 18시간 동안 방치하였다. 96 웰 플레이트의 내용물을 쏟듯이 털어 버린 후, 0.1%의 트윈 20 (Sigma, Cat# D8654)이 함유된 PBS (Gibco BRL) 세척 용액(PBS-T, 0.1%)으로 4회 세척하였다. 바이오틴-결합된 mAb (7-B6-1 biotin)를 세척 용액에 1% BSA를 첨가하여 만든 블록킹 버퍼(blocking buffer)로 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도가 되게 희석하여 $50\mu\text{l}$ 씩 웰에 첨가한 후 2시간 동안 반응시켰다. 세척 용액(PBS-T, 0.1%)으로 4회 세척한 후 다시 블록킹 버퍼로 100분의 1로 희석된 스트렙타비딘(streptavidin)-HRP 용액을 채워주고 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 AEC 기질 용액을 사용하여 발색을 유도하였고, 스폿(Spot)이 적당한 크기로 보일 때(5-10분) 수돗물을 사용해서 발색 반응을 중단시켰다. 상온에서 96 웰 플레이트를 건조시킨 후 ELISPOT 판독기로 IFN- γ 를 분비하는 세포의 수를 측정하였다.

247> 재조합 아데노 바이러스로 부스팅한 후 2주 시점에서 위 실험을 실시한 결과, 침팬지마다 개체의 차이를 보이지만 6마리중 4마리에서 백만 개의 면역 세포당 1000개 이상의 IFN- γ 를 분비하는 세포가 있음을 보였다. 나머지 2마리의 침팬지는 비록 전술한 4마리와 같은 높은 수치의 면역 반응을 보인 것은 아니지만, 400-600개의 HCV 항원 특이적인 세포성 면역 반응을 나타내었다. 실험군 1과 실험군 2의 차이는 관찰되지 않았다. 또한 대조군으로 사용했던 #404 침팬지에서도 백만

제외 면역 세포당 1200개 이상의 IFN- γ 를 분비하는 세포가 있음을 보였는데, 이는 본 실시예가 비특이적인 면역 반응을 나타내기 때문이 아니라, 과거의 어느 시점에서 감염양 이하의 양이 노출된 적이 있음을 의미하는 것이다. 이런 경우에 바이러스혈증은 나타나지 않지
 유도된 세포성 면역 반응은 각인되어 오랜 시간이 지난 후에도 특이적인 반응을
 (Shata MT, 2002, *9th International Meeting on HCV and Related Viruses*,
 혈액 센터 (New York Blood Center)에서의 최근 실험을 통해 얻어진 결과와 일치
 이 결과는 본 발명이 대동물에서도 효과적으로 세포성 면역 반응을 유도하였다
 사실을 보여주고 있다.

- 248> 실시예 15> 침팬지에서의 CD4+ T 세포에 의해 분비되는 IFN- γ 사이토카인의 정량 및 CD4+ T 세포의 증식(T cell proliferation assay)의 관찰
- 249> 재조합 아데노 바이러스로 부스팅한 지 2주 후에, 위 실시예에서 언급한 방법대로 PBMC를 분리하여 CD4+ T 세포로부터 HCV 항원에 특이적으로 분비하는 IFN- γ 의 양을 측정하였다. 본 실시예에서는 BD 파밍젠(pharmingen)사의 IFN- γ ELISA 키트를 사용하였다. 침팬지로부터 분리한 PBMC를 2×10^5 세포/웰의 농도로 사람 재조합 IL-2 단백질이 결여된 성장용 배지(50 units/ml 페니실린, 50 μ g/ml 스트렙토마이신, 50 μ M β -머캅토에탄올, 100 M MEM 비필수 아미노산, 2mM L-글루타민, 1mM 소듐 파이루베이트, 10mM HEPES와 10% ABS (human AB serum, Valley

Biomedical, Lot# A20124)를 함유하는 RPMI-1640)로 희석시킨 후, 둥근바닥(round) 96 웰 플레이트에 옮기고 각각 다음과 같은 특이 항원으로 자극을 주었다. 최종 농도로 환산했을 때, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 PHA를 양성 대조군으로 선정했고, HCV에 특이적인 항원으로는 모두 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 GST-코아(Core), GST-NS3, NS5 재조합 단백질을 사용하였고, 음성 대조군(negative control)로서 재조합 사람 SOD(superoxide dismutase)를 사용하였다. 이러한 자극 조건 하에서 5일간 37°C 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다. 5일째 되는 날에 세포 배양액(culture supernatant) 100 μl 를 취해서 IFN- γ ELISA 키트(BD pharmlngen사)를 사용하여 제조사의 표준 프로토콜에 준해서 IFN- γ 의 정량에 사용하였고, 나머지 세포층에는 웰(well) 당 1 μCi 의 ³H-티미딘(Thymidine)을 첨가하여 CD4+ T 세포의 증식정도를 관찰하는데 사용하였다. ³H-티미딘을 첨가한지 18시간 후에 자동 세포 수확기(automatic cell harvester, Micro 96 Cell harvester, Model 11055, Skatron Instruments Inc, VA)를 이용해서 유리 여과지 (Glass filter paper ; Wallac, Finland, Cat# 1205-401)에 수확한 후, ³H-티미딘이 유입된 정도를 액체 섬광 계수기 (Liquid Scintillation counter ; Microbeta Plus 1450 Liquid Scintillation Counter (Wallac))를 통해 측정하였다. HCV 항원 특이적으로 유입된 방사능 정도(cpm)를 rhSOD로 자극했을 때 유입된 정도로 나누어 증식 수치 (Stimulation Index)로 나타내었다.

<250> 본 실시예에서 나타난 결과를 보면, CD4+ T 세포에 의한 IFN- γ 분비를 조사했을 때, 백신을 투여한 침팬지들에게서 HCV의 비구조 단백질에 특이적인 반응을 관찰할 수 있었고, 대조군에서는 미약한 반응이 관찰되었다. 이러한 결과는 HCV의 여러 항원중 비구조 단백질 영역이 세포성 면역 반응을 잘 유도한다는 기존의 보고(Missale, 1996, *J Clin Invest* 98: 706)와도 일치하고 있다. 이때, 실험군 1이 실험군 2에 비해 높은 정도의 IFN- γ 가 분비됨을 알 수 있었다.

- 251> 또한, CD4+ T 세포의 증식 정도를 관찰한 경우, 역시 백신을 투여한 실험군에서 HCV의 비구조 단백질에 특이적으로 평균 20정도에 해당하는 증식 수치(stimulation index)를 보였다. 전체적으로는 CD4+ T 세포에 의한 IFN- γ 의 분비와 유사한 형태를 띄고 있으나, 대조군의 경우 한 마리 침팬지(#406)가 실험군의 침팬지가 보인 값과 유사한 수치의 항원 특이 반응을 보이고 있다. 이 또한 IFN- γ ELISPOT 분석에서의 현상과 같은 이유로 설명될 수 있다.
- 252> 결론적으로, 위 실시예들은 본 발명이 대동물에서도 효과적인 세포성 면역 반응을 유도할 수 있었음을 침팬지 실험을 통해서 입증하고 있다.
- 253> <실시예 16> 침팬지에서의 C형 간염 바이러스의 정량
- 254> 감염성 C형 간염 바이러스를 접종(challenge)하고 난 후, 본 발명에 의해 유도된 세포성 면역 반응이 얼마나 효율적으로 C형 간염 바이러스의 증식(복제)을 억제하는지를 혈중에 존재하는 바이러스의 양을 측정함으로써 조사하였다. 본 실시예는 뉴욕 혈액 센터에 의뢰하여 침팬지의 혈액에서 채취한 플라스마를 시료로 사용하여 정량적(quantitative) PCR 방법으로 측정되었다. 간략하게는 이미 양이 결정된 표준 HCV RNA를 기준으로 하여 10 μ l의 플라스마 시료와 함께 10 μ l의 M-MLV 역전사 효소가 들어 있는 역전사 반응 믹스(RT mix; 4 μ l의 5X RT buffer from Gibco, 1 μ l의 100mM DTT, 1 μ l의 10mM dNTP, 0.5 μ l의 100 μ M HCV-R 프라이머 (서열번호 37), 0.1 μ l의 4U/ μ l의 RNasin, 0.1 μ l의 200U/ μ l M-MLV과 3.3 μ l의 H₂O)를 혼합하여 역전사를 42°C에서 실시한 후, 생성물에 30 μ l의 PCR 혼합물(PCR mix; 3 μ l의 PCR 버퍼, 4 μ l의 200mM MgCl₂, 0.05 μ l의 100 μ M HCV-F 프라이머 (서열번호 38), 1 μ l의 200ng/ μ l CMB3 형광 프로브 (5-FAM 서열번호 39 DABCYL-3), 0.25 μ l의 5U/ μ l TaqGold 중합효소, 21.7 μ l의 H₂O)을 첨가하여 연쇄 중합

기(PE 7700, Perkin Elmer)를 사용, 중합 반응(PCR)을 수행하였다. 중합 반응에 이용된 온도 조건은, 예열을 95℃ 에서 10분간 실시한 후, 95℃에서 30초, 55℃에서 60초 그리고 72℃에서 30초씩 45회의 주기(cycle)로 실시하였다. 모든 과정이 끝난 후, 바이러스 RNA의 양은 PE 7700 연쇄 중합기에서 제공하는 소프트웨어를 이용하여 계산하였다.

255> 본 실시예에서 나타난 결과는 100 CID₅₀의 감염성 C형 간염 바이러스로 접종(challenge)한 후 각각 0, 2, 4주 후에 실시한 것으로, 감염 초기의 바이러스 복제를 대변하고 있다. 결과에서 보이는 바와 같이, 대조군에서는 2주와 4주 시점에서 각각 10^{5.45}, 10⁶에 해당하는 바이러스량을 보임으로써, 본 실시예에 사용된 감염성 바이러스의 감염도를 확인해 줄 뿐 아니라, 실험군과의 대조를 위한 바이러스의 수치를 보여주고 있다. 반면에, 백신이 투여된 실험군의 침팬지 중 5마리는 2주 시점에서 거의 바이러스를 검출할 수 없었다. #400과 #381의 수치는 본 실시예의 검출경계치(10^{2.95})에 유사한 값이어서 확인을 위해 재 실험을 실시했을 때 검출이 되지 않았다. 위 결과는 각 실험결과에서 얻은 수치의 평균값으로 나타내었다. 그러나, 4주 시점에서는 검출 경계치보다 약간 상위하는 값을 보였다. 실험군의 모든 침팬지에서 얻어진 바이러스량의 평균치와 대조군의 평균치를 비교하면 100배 가량의 차이를 보이고 있다. 일반적으로 HCV에 대한 면역 반응이 유도되지 않은 대조군(naive) 침팬지의 경우, 1.02주에서 1.14주부터 바이러스가 검출되기 시작해서 6주 경에 10^{5.8}에 해당하는 최대 바이러스량을 보인다 (Prince AM, 2002,

9th International Meeting on HCV and Related Viruses, P-259). 또한 HCV에 대한 초기 감염으로부터 회복되어 HCV에 대한 면역 반응을 간직하고 있는, 즉 HCV에 방어 면역이 유도되어 있으리라고 생각되는 침팬지를 대상으로 재감염을 통해 조사한 바로는, 최초 감염시에 비해 최대 바이러스량이 10배에서 100배까지 감소할 뿐 아니라, 감염후 바이러스가 존재하는 기간이나 최대 바이러스량을 나타내는 시점이 단축된다(Bassett SE, 2001, *Hepatology* 33:1479 -1487)는 점이다. 이러한 근거에 비추어 볼 때, 본 실시예에서 보여지고 있는, 감염 초기의 바이러스 증식 정도가 100배 이하로 감소되었다는 점은, 항원 특이적인 세포성 면역 반응의 유도와 함께 만성 감염을 차단하리라는 결론으로 이어진다. 그러나, 감염 초기에서의 방어 효과로 만성 감염에 대한 차단효과를 최종적으로 증명하기 위해서는 감염 후 오랜 시간 동안의 지속적인 관찰이 필요하다. 본 실시예의 결과는 본 발명의 백신이 실제 감염성 바이러스의 감염에 대한 방어 면역을 유도할 수 있음을, HCV의 유일한 실험동물 모델인 침팬지를 사용하여 검증한 것이다.

<256> 침팬지 실험을 통해 얻은 결론은, 본 발명자들이 소동물 모델에서 항원 조작 과정을 통해 고안한 백신과, Th 1 면역 반응을 증가시키는 방법인 DNA 프라이밍 - 재조합 아데노 바이러스 부스팅 전략이, 인간을 가장 잘 대변할 수 있는 침팬지 모델에서 효과적인 세포성 면역 반응을 유도하였고, 이렇게 유도된 세포성 면역 반응이 감염성 HCV에 대한 방어 면역으로 작용하여 HCV에 대한 예방 백신으로 작용할 수 있다는 것이다.

【발명의 효과】

257> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 플라스미드는 다중-에피토프 특이적인 세포성 면역 반응을 유도하기 위해 거의 전체 HCV 유전자를 백신으로 채택했으며, 이들의 효율적인 면역 원성을 위해 최적의 크기를 탐색해서 전체를 3 부분으로 나눈 유전자 백신을 제작하였다. 뿐만 아니라, 코아(Core)의 아미노 말단부 40개 아미노산을 제거하여 코아(Core)가 간직하고 있는 면역 억제기능을 제거하였고, E2의 막관통 도메인을 그대로 포함시킴으로써, 제거했을 경우보다 높은 면역원성을 갖는 백신을 제작하였다. HCV의 방어 면역에 중요한 Th 1 면역 반응에 초점을 맞추어, DNA 프라이밍과 재조합 아데노 바이러스 부스팅으로 각각으로만 면역화한 경우보다 높은 CD4+ T 세포 반응을 보이는 백신 투여 방법(vaccination regimen)을 선택하였다. 상기의 발명은 HCV의 유일한 실험동물 모델인 침팬지 실험을 통해서, 첫 째 효율적인 세포성 면역 반응을 유도함을 관찰하였고, 둘째로 감염성 C형 간염 바이러스에 대해 초기 시기에서 방어 효과를 보임을 관찰하였다. 따라서, 본 발명은 C형 간염 바이러스에 대한 예방 백신으로서 그 효능을 입증하였고, 이와 같은 용도로 유용하게 사용될 수 있다.

【특허청구 범위】

【청구항 1】

경 바이러스(Hepatitis C Virus; HCV)의 전체 항원 유전자 중에서 2kb 내지 6 kb 유전자를 포함하는 플라스미드를 함유하는 DNA 백신.

제 1항에 있어서, HCV의 전체 항원 유전자 중에서 2kb 내지 4 kb에 해당하는 유전자를 포함하는 플라스미드를 함유하는 DNA 백신.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 코아(Core), E1 및 E2 유전자를 포함하는 제 1플라스미드, NS3 및 NS4 유전자를 포함하는 제 2플라스미드 및 NS5 유전자를 포함하는 제 3플라스미드를 모두 함유하는 것을 특징으로 하는 DNA 백신.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 상기 제 1플라스미드의 코아 유전자는 코아 단백질의 N말단부터 35개 내지 40개의 아미노산을 암호화하는 염기서열이 제거된 것을 특징으로 하는 DNA 백신.

【청구항 5】

제 4항에 있어서, 상기 제 1플라스미드의 코아 유전자는 코아 단백질의 N말단부터 40개의 아미노산을 암호화하는 염기서열이 제거된 것을 특징으로 하는 DNA 백신.

【청구항 6】

제 3항에 있어서, 상기 제 1플라스미드의 E2 유전자는 E2 단백질의 막관통(transmembrane) 도메인을 보유하고 있는 것을 특징으로 하는 DNA 백신.

【청구항 7】

제 3항에 있어서, 상기 제 1플라스미드는 서열번호 50으로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 백신.

【청구항 8】

제 7항에 있어서, 상기 제 1플라스미드는 pGX10 gDs Δ ST (수탁번호: KCCM 10415)인 것을 특징으로 하는 DNA 백신.

【청구항 9】

제 3항에 있어서, 상기 제 2플라스미드는 서열번호 51로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 백신.

【청구항 10】

제 9항에 있어서, 상기 제 2플라스미드는 pGX10 NS34 (수탁번호: KCCM 10417)인 것을 특징으로 하는 DNA 백신.

【청구항 11】

제 3항에 있어서, 상기 제 3플라스미드는 서열번호 52로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 백신.

【청구항 12】

제 11항에 있어서, 상기 제 3플라스미드는 pGX10 NS5 (수탁번호: KCCM 10416)인 것을 특징으로 하는 DNA 백신.

【청구항 13】

제 3항에 있어서, 상기 제 1플라스미드는 서열번호 50으로 표시되는 염기서열을 포함하고, 상기 제 2플라스미드는 서열번호 51로 표시되는 염기서열을 포함하고, 상기 제 3플라스미드는 서열번호 52로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 DNA 백신.

【청구항 14】

제 13항에 있어서, 상기 제 1플라스미드는 pGX10 gDs Δ ST (수탁번호: KCCM 10415)이고, 상기 제 2플라스미드는 pGX10 NS34 (수탁번호: KCCM 10417)이고, 상기 제 3플라스미드는 pGX10

NS5 (수탁번호: KCCM 10416)인 것을 특징으로 하는 DNA 백신.

【청구항 15】

제 14항에 있어서, pGX10 hIL-12^m을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 DNA 백신.

【청구항 16】

HCV의 전체 항원 유전자 중에서 2kb 내지 6 kb에 해당하는 유전자를 포함하는 아데노 바이러스를 함유하는 재조합 아데노 바이러스 백신.

【청구항 17】

제 16항에 있어서, HCV의 전체 항원 유전자 중에서 2kb 내지 4 kb에 해당하는 유전자를 포함하는 아데노 바이러스를 함유하는 재조합 아데노 바이러스 백신.

【청구항 18】

제 16항에 있어서, 코아(Core), E1 및 E2 유전자를 포함하는 제 1아데노 바이러스, NS3 및 NS4 유전자를 포함하는 제 2아데노 바이러스 및 NS5 유전자를 포함하는 제 3아데노 바이러스를 모두 함유하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신.

【청구항 19】

제 18항에 있어서, 상기 제 1아데노 바이러스의 코아 유전자는 코아 단백질의 N말단부터 35개 내지 40개의 아미노산을 암호화하는 염기서열이 제거된 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신.

【청구항 20】

제 19항에 있어서, 상기 제 1아데노 바이러스의 코아 유전자는 코아 단백질의 N말단부터 40개의 아미노산을 암호화하는 염기서열이 제거된 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신.

【청구항 21】

제 18항에 있어서, 상기 제 1아데노 바이러스의 E2 유전자는 E2 단백질의 막관통 (transmembrane) 도메인을 보유하고 있는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신.

【청구항 22】

제 18항에 있어서, 상기 제 1아데노 바이러스는 서열번호 50으로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신.

【청구항 23】

제 22항에 있어서, 상기 제 1아데노 바이러스는 rAd gDs Δ ST (수탁번호: KCCM 10418)인 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신.

【청구항 24】

제 18항에 있어서, 상기 제 2아데노 바이러스는 서열번호 54로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신.

【청구항 25】

제 24항에 있어서, 상기 제 2아데노 바이러스는 rAd gDs NS34 (수탁번호: KCCM 10420)인 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신.

【청구항 26】

제 18항에 있어서, 상기 제 3아데노 바이러스는 서열번호 52로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신.

【청구항 27】

제 26항에 있어서, 상기 제 3아데노 바이러스는 rAd NS5 (수탁번호: KCCM 10419)인 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백신.

【청구항 28】

제 18항에 있어서, 상기 제 1아데노 바이러스는 서열번호 50으로 표시되는 염기서열을
상기 제 2아데노 바이러스는 서열번호 54로 표시되는 염기서열을 포함하고, 상기 제
바이러스는 서열번호 52로 표시되는 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합
러스 백신.

【청구항 29】

제 28항에 있어서, 상기 제 1아데노 바이러스는 rAd gDs Δ ST (수탁번호: KCCM 10418)이
상기 제 2아데노 바이러스는 rAd gDs NS34 (수탁번호: KCCM 10420)이고, 상기 제 3아데노
바이러스는 rAd NS5 (수탁번호: KCCM 10419)인 것을 특징으로 하는 재조합 아데노 바이러스 백
신.

【청구항 30】

제 1항의 DNA 백신으로 프라이밍(priming)한 후 제 16항의 재조합 아데노 바이러스 백신
으로 부스팅(boosting)함으로써 HCV에 대한 면역력을 증진시키는 것을 특징으로 하는 백신 투
여 방법.

【청구항 31】

제 30항에 있어서, 상기 DNA 백신의 프라이밍 횟수는 2회 내지 5회인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 32】

제 31항에 있어서, 상기 DNA 백신의 프라이밍 횟수는 3회인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 33】

제 13항의 DNA 백신으로 3회 프라이밍한 후 제 28항의 재조합 아데노 바이러스 백신으로 1회 부스팅함으로써 HCV에 대한 면역력을 증진시키는 것을 특징으로 하는 백신 투여 방법.

【청구항 34】

제 1항의 DNA 백신으로 프라이밍한 후 제 16항의 재조합 아데노 바이러스 백신으로 부스팅함으로써 CD4+ Th1 면역반응을 증진시키는 것을 특징으로 하는 HCV에 대한 면역력을 증진시키는 방법.

【청구항 35】

제 13항의 DNA 백신으로 3회 프라이밍한 후 제 28항의 재조합 아데노 바이러스 백신으로 1회 부스팅함으로써 CD4+ Th1 면역반응을 증진시키는 것을 특징으로 하는 HCV에 대한 면역력

을 증진시키는 방법.

【청구항 36】

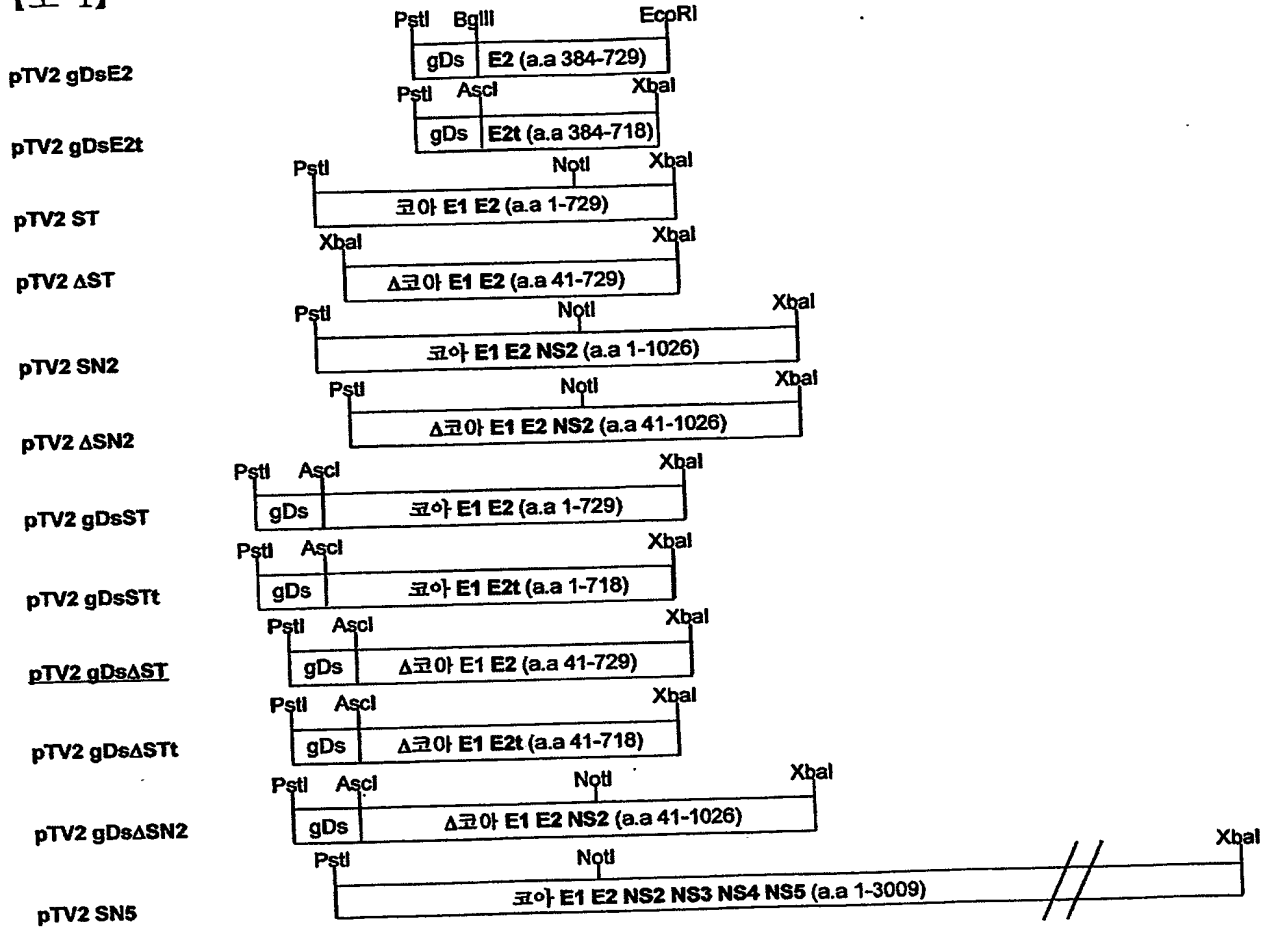
제 1항의 DNA 백신으로 프라이밍한 후 제 16항의 재조합 아데노 바이러스 백신으로 부스팅하는 것을 특징으로 하는 C형 간염의 예방 또는 치료 방법.

【청구항 37】

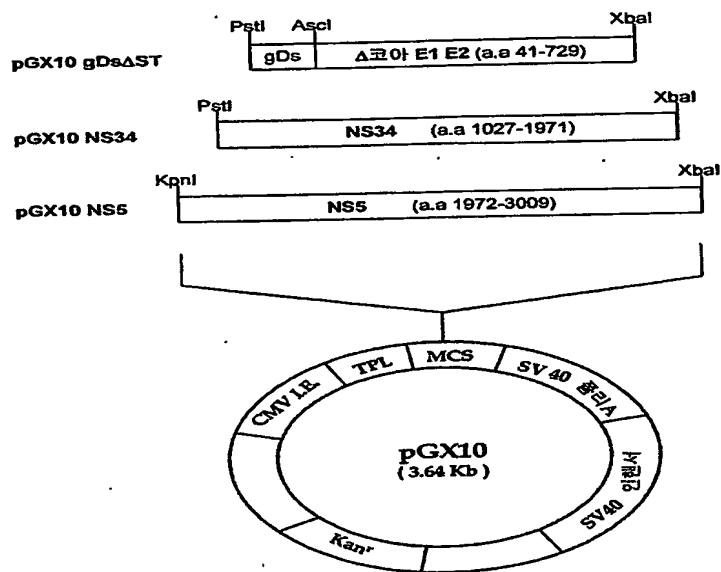
제 13항의 DNA 백신으로 3회 프라이밍한 후 제 28항의 재조합 아데노 바이러스 백신으로 1회 부스팅하는 것을 특징으로 하는 C형 간염의 예방 또는 치료 방법.

【도면】

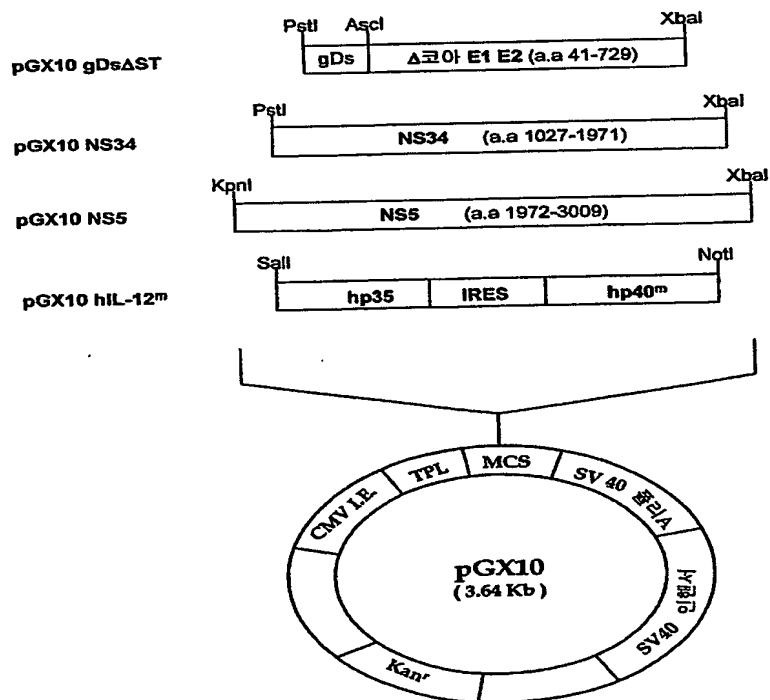
【도 1】



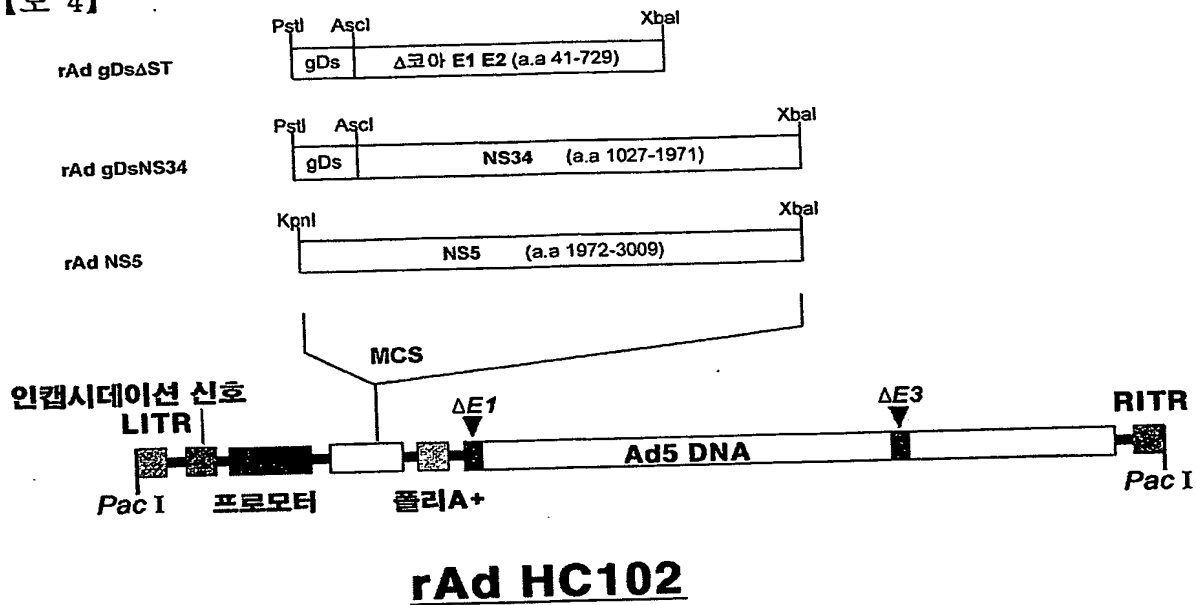
【도 2】
HC102



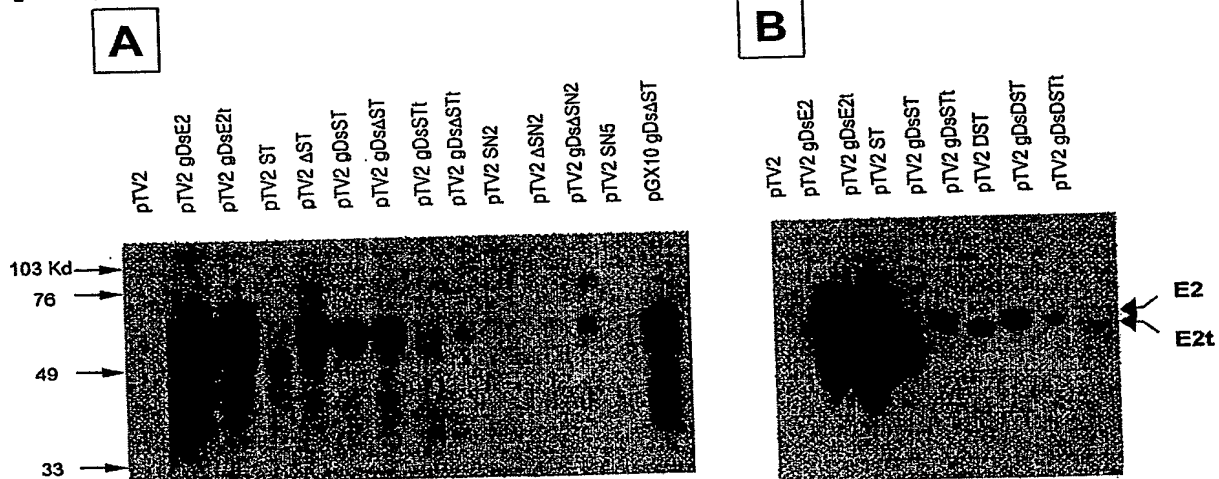
【도 3】
HC103



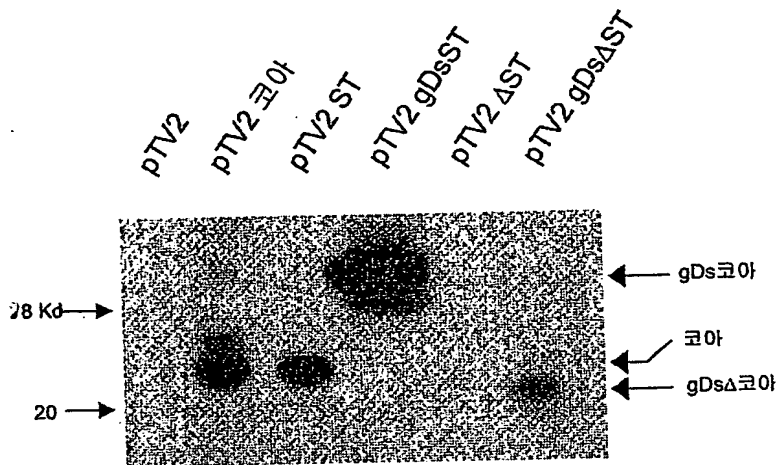
【도 4】



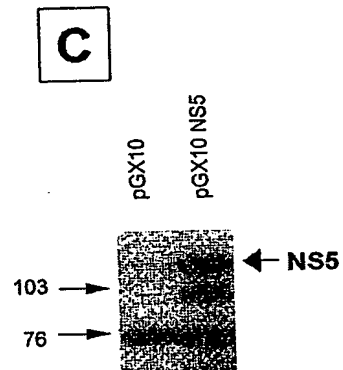
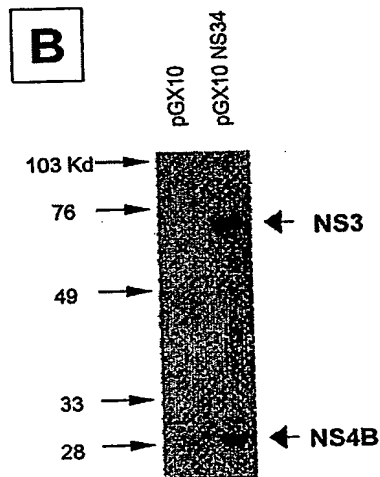
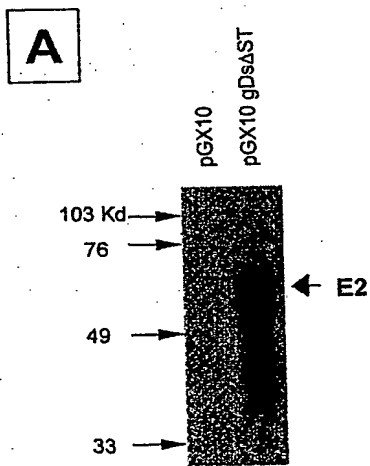
【도 5】



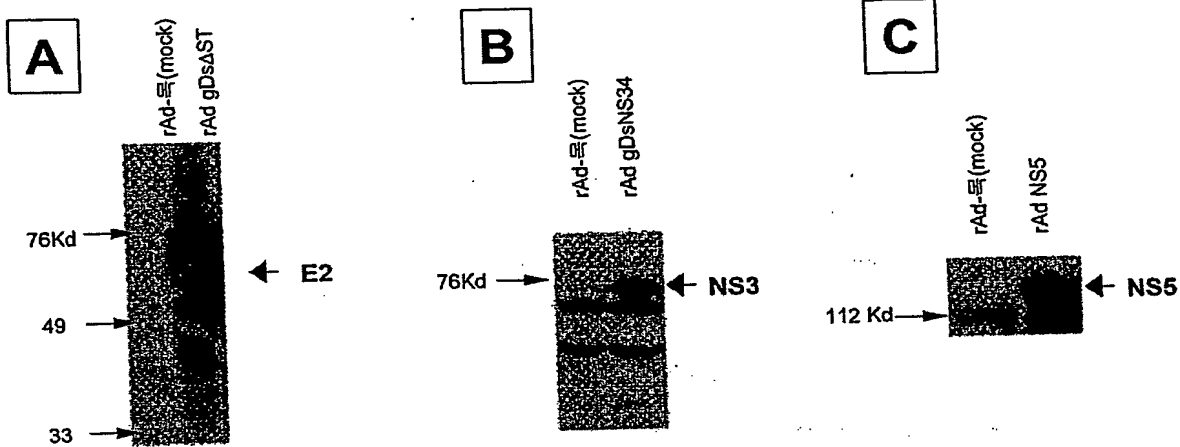
(F 9)
COS-7



(7)
COS-7



【도 8】
293A

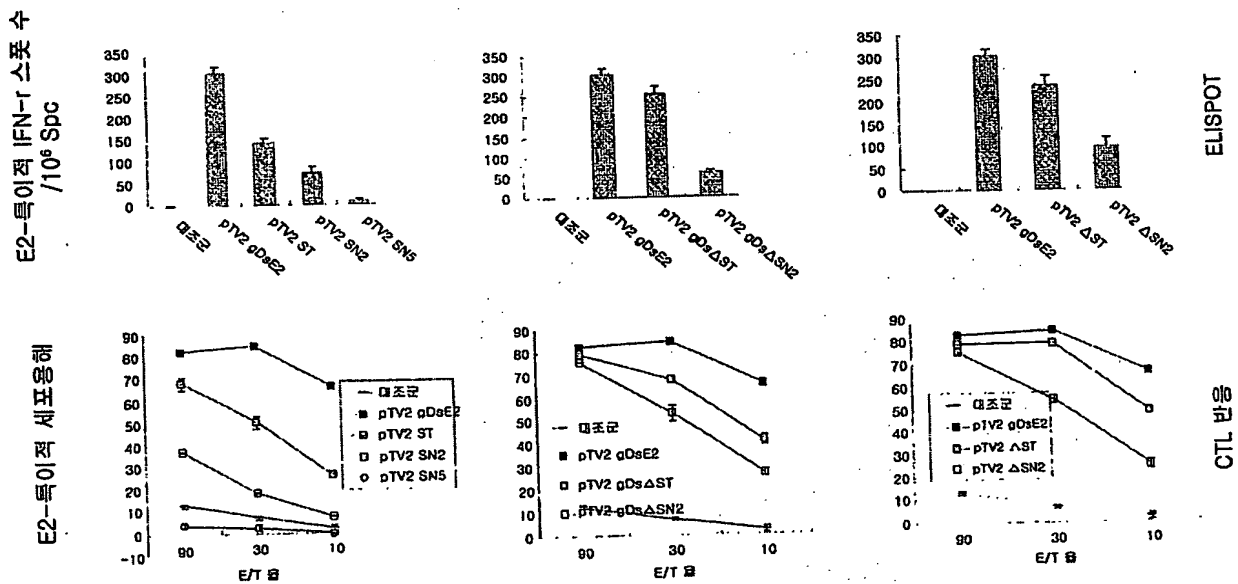


【도 9】

크기의 최적화

(면역화 후 5주)

E2 특이적 IFN- γ ELISPOT & CTL 반응
Balb/c 마우스
자극 세포: 2×10^4 CT26-hghE2t/웰

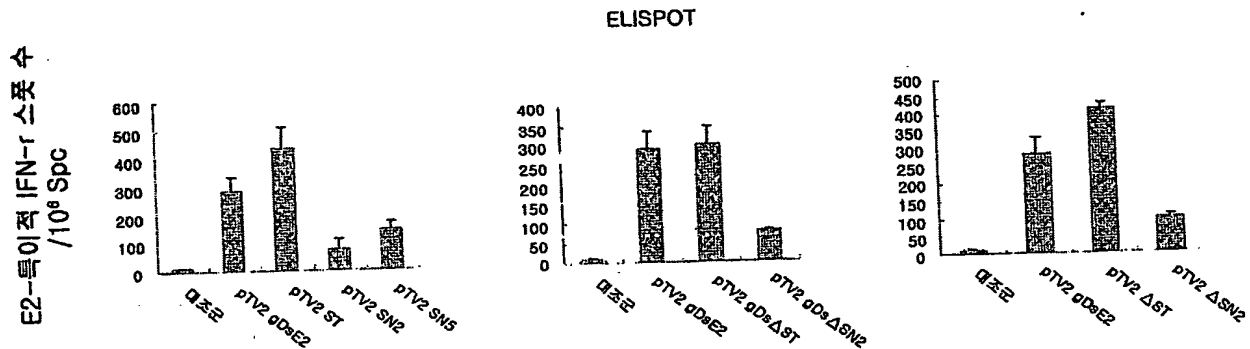


【도 10】

크기의 최적화

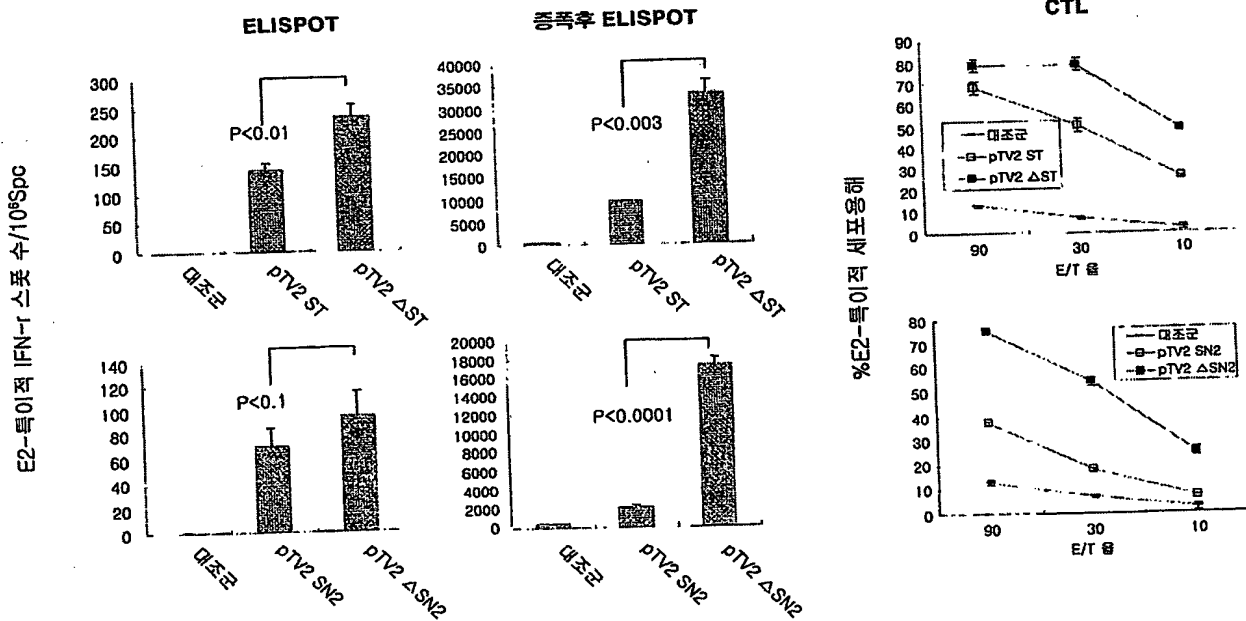
(부스팅후 3.4주)

E2 특이적 IFN- γ ELISPOT 반응
Balb/c 마우스
자극 세포: 2×10^4 CT26-hghE2t/웰



【도 11】

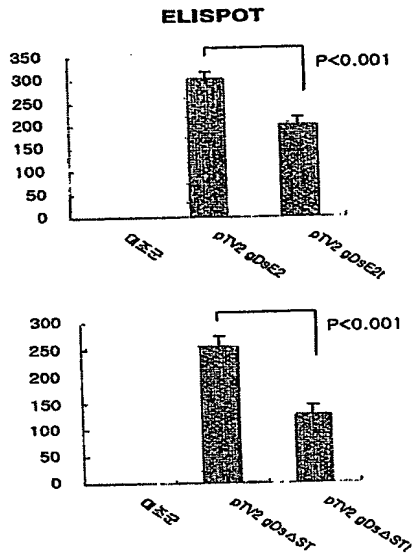
코아의 N-말단 절단
(면역화 후 5주)



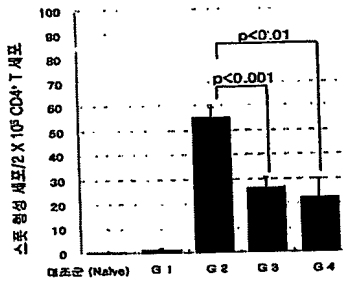
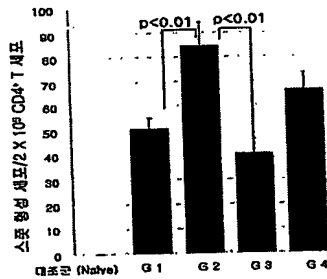
【도 12】 E2 TM 도메인의 절단

면역화 후 5주

부스팅 후 3.4주

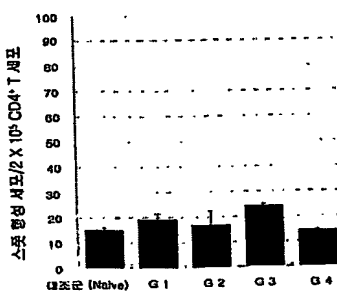
E2-특이적 IFN- γ 스폿 수/10⁵Spc

【도 13】

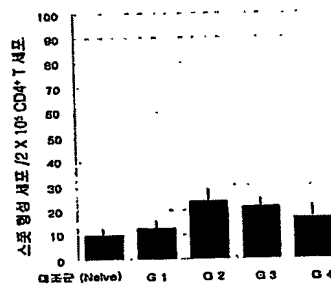
a. E2 특이적 IFN- γ ELISPOTb. 코아(core)특이적 IFN- γ ELISPOT

대조군 (Naive): 생리식염수가 주
입된 대조군
G 1: pGX10 gDs Δ ST + pGX10
mIL-12mutant 주입 ->
pGX10 gDs Δ ST + pGX10
mIL-12mutant 주입
G 2: pGX10 gDs Δ ST + pGX10
mIL-12mutant 주입 ->
rAd gDs Δ ST 주입
G 3: rAd gDs Δ ST 주입 -> rAd
gDs Δ ST 주입
G 4: rAd gDs Δ ST 주입 ->
pGX10 gDs Δ ST + pGX10
mIL-12mutant 주입

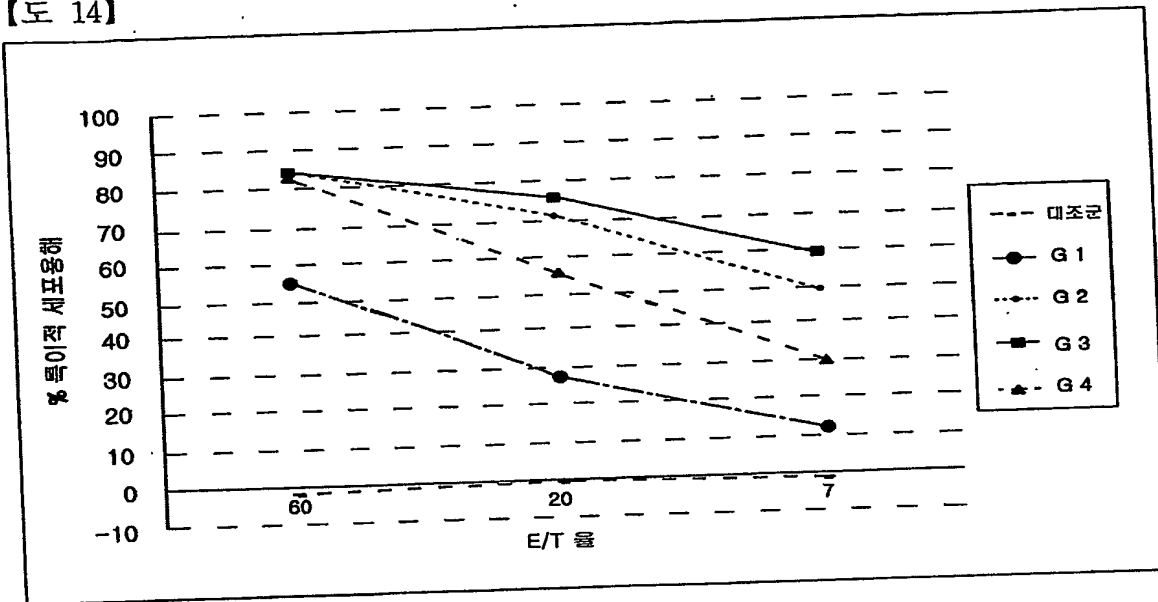
c. E2 특이적 IL-4 ELISPOT



d. 코아(core)특이적 IL-4 ELISPOT



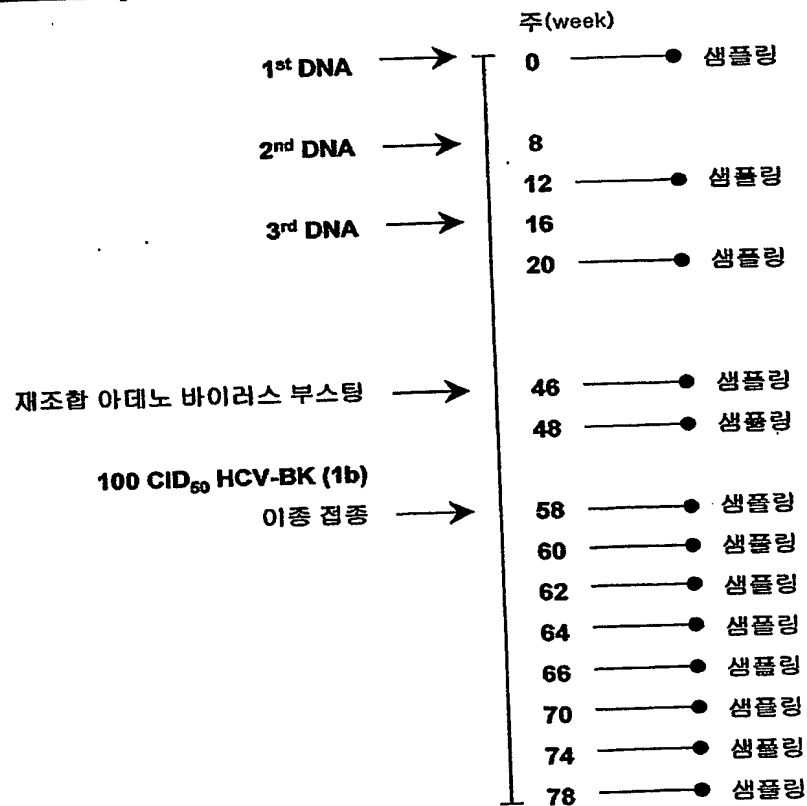
【도 14】



【도 15】

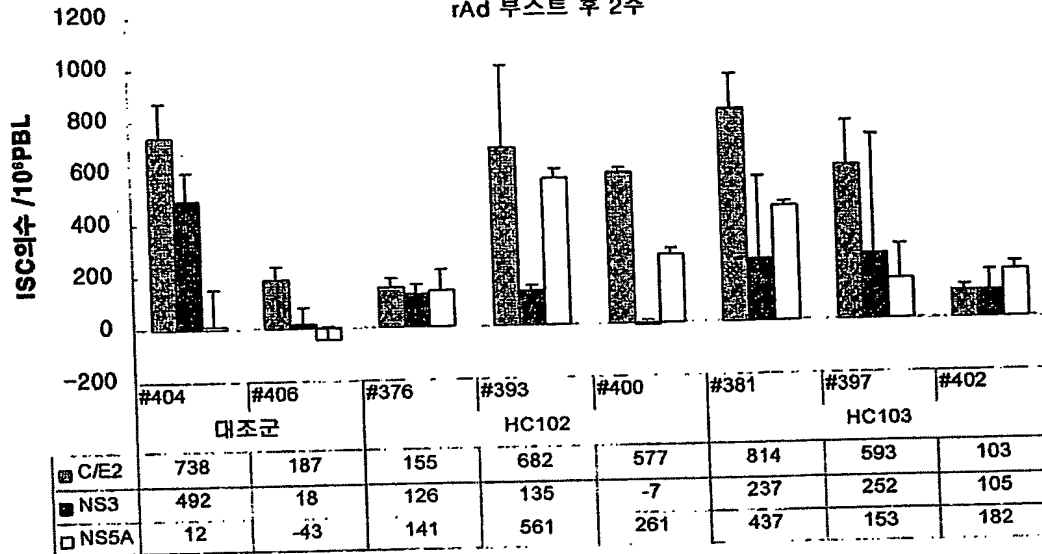
계 획(schedule)

DNA 프라임/ rAd 부스트



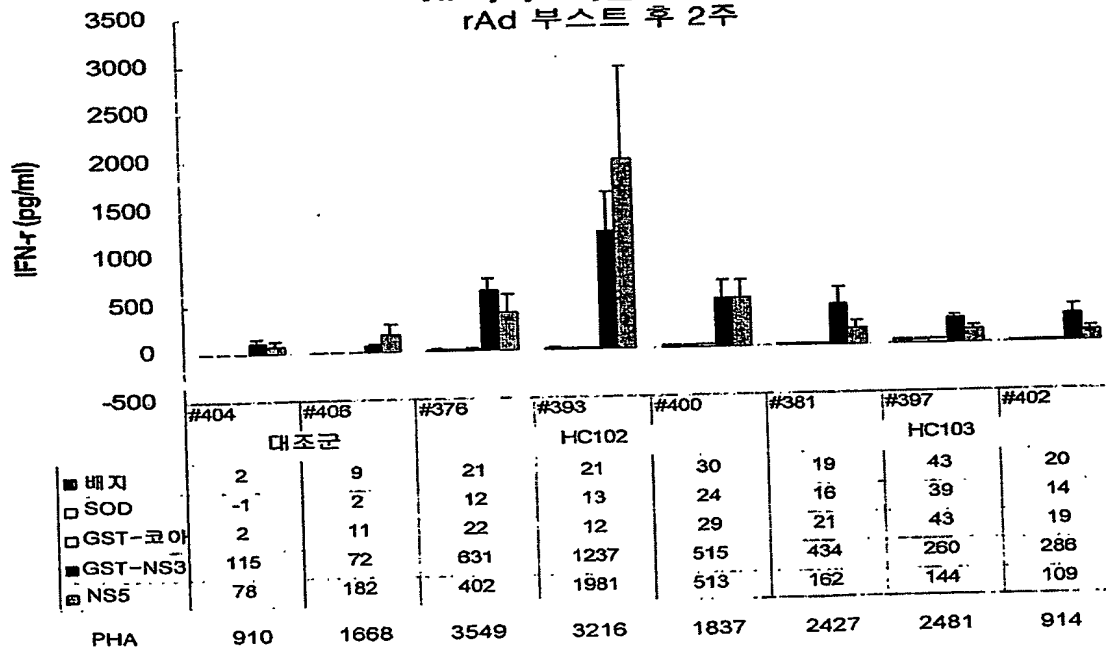
【도 16】

IFN- γ ELISPOT 분석
rAd 부스트 후 2주



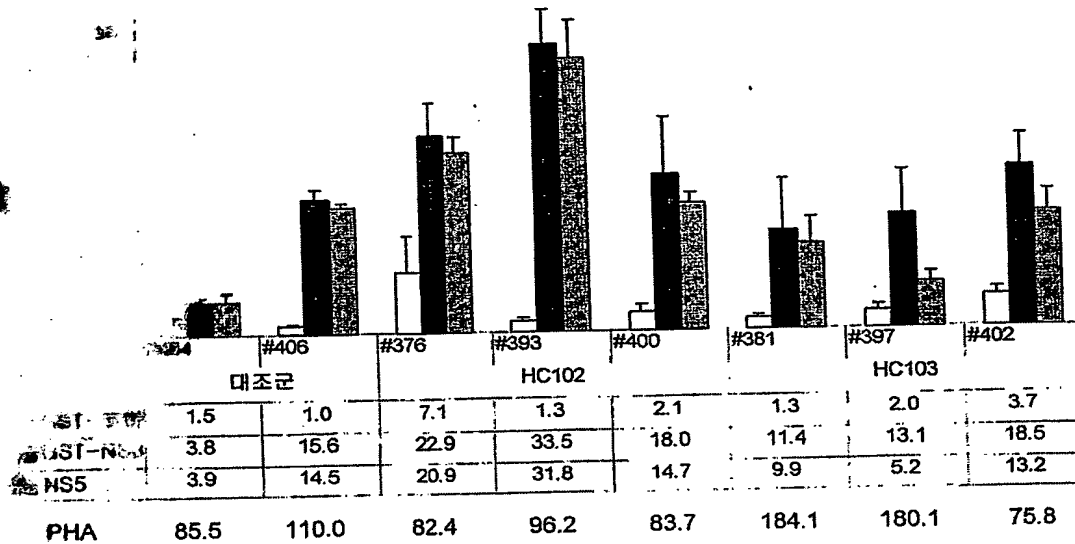
【도 17】

Th 사이토카인 프로파일
rAd 부스트 후 2주



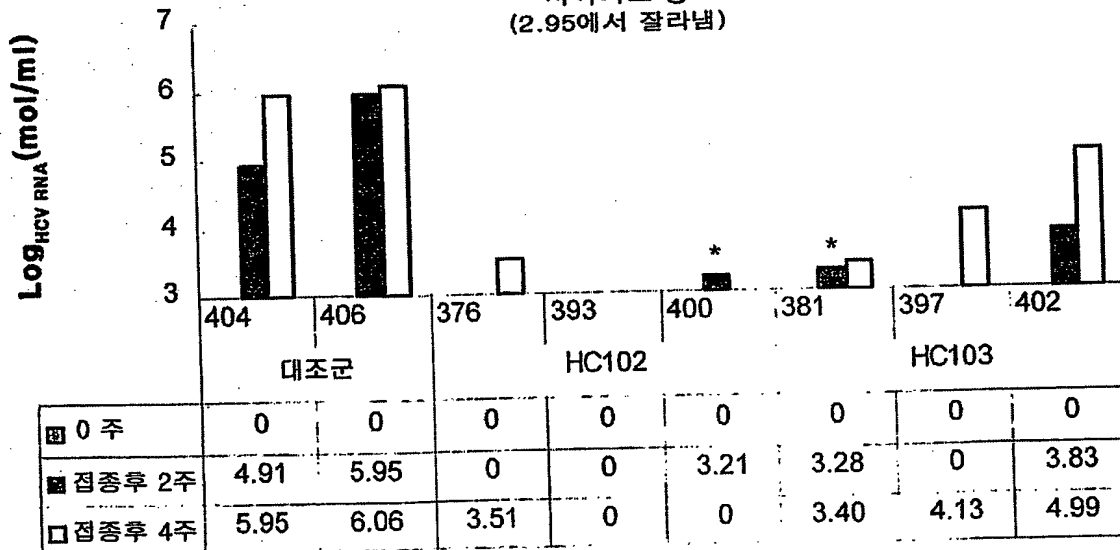
[18]

T 세포 증식 반응
rAd 부스트 후 2주



[19]

정량적 RT-PCR에 의한 HCV 바이러스 양의 측정
바이러스 양
(2.95에서 잘라냄)

HCV RNA의 검출한계는 2.95log₁₀ 임

* 3차례 측정의 평균 바이러스 양, 이들 중 하나는 음의 값이었음

【도 20a】

코아 펩타이드 풀의 아미노산 서열

Acore (43-151)		
No	Name	Sequence
#1	HCU42-62	RLGURATRTT SERSQPRGR
#2	HCU53-72	SERSQPRGR QP IPRARQFE
#3	HCU63-82	QP IPRARQFE SRTQAQPGWP
#4	HCU73-92	GRTQAQPGWP WPLYGHEGLG
#5	HCU83-102	WPLYGHEGLG WAGLLSPRG
#6	HCU92-112	WAGLLSPRG SRPSUGPTDP
#7	HCU103-122	SRPSUGPTDP RRRSRRLGKV
#8	HCU113-122	RRRSRLGKV IDTLTCGFAD
#9	HCU123-142	IDTLTCGFAD LHGYIPLUGA
#10	HCU133-152	LHGYIPLUGA PLGGUARALA
#11	HCU142-152	PLGGUARALA HGVLLLEDGV
#12	HCU153-172	HGVLLLEDGV NYATGMLPGC

【도 20b】

E21 펩타이드 풀의 아미노산 서열

E21 (384-712)					
No	Name	Sequence	No	Name	Sequence
#13	HCU384-403	STRUTGGTGG RTTTRFVSIF	#29	HCU554-573	EDMTGTFKI CGPPPCDICC
#14	HCU404-423	ASGPDQRIGL VDRHGSHIN	#30	HCU564-583	CGPPPCDICC UGRNTLTCTP
#15	HCU414-433	VDRHGSHIN RTALNCHDEL	#31	HCU574-593	UGRNTLTCTP DCTMRDEAT
#16	HCU424-443	RTALNCHDEL SSGTIAALFY	#32	HCU584-603	DCTMRDEAT YTRCGSGPML
#17	HCU434-453	SSGTIAALFY TRKTDSSGCP	#33	HCU594-613	YTRCGSGPML TPACHUDVPY
#18	HCU444-463	TRKTDSSGCP ERHASCRP ID	#34	HCU604-623	TPACHUDVPY RLNNYPTIN
#19	HCU454-473	ERHASCRP ID KFAQSGGSIY	#35	HCU614-633	RLNNYPTIN ITIFIRSHYV
#20	HCU464-483	KFAQSGGSIY YAESGGSDQR	#36	HCU624-643	ITIFIRSHYV GGUERDLDA
#21	HCU474-493	YAESGGSDQR PYCHMYAPRQ	#37	HCU634-653	GGUERDLDA CHTRGGERD
#22	HCU484-503	PYCHMYAPRQ CGTUPASQUC	#38	HCU644-663	CHTRGGERD LEDRDRSEL3
#23	HCU494-513	CGTUPASQUC GPVYCTTPSP	#39	HCU654-673	LEDRDRSEL3 PLLLTTEWQ
#24	HCU504-523	GPVYCTTPSP UVUGTIDRSG	#40	HCU664-683	PLLLTTEWQ ULPCSTITLP
#25	HCU514-533	UVUGTIDRSG APTTYUGENE	#41	HCU674-693	ULPCSTITLP ALSTGLNLR
#26	HCU524-543	APTTYUGENE TDVLLLENTR	#42	HCU684-703	ALSTGLNLR QNIVHAQHLR
#27	HCU534-553	TDVLLLENTR PPQANQFCT	#43	HCU694-712	QNIVHAQHLR GUGSAMVSIV
#28	HCU544-563	PPQANQFCT EDMTGTFKI			

【도 20c】

NS3 프로테아제 펩타이드 풀의
아미노산 서열

NS3 protease (1029-1217)		
#44	gHCU-1029	ITAYGQQTGGLGCITISLT
#45	gHCU-1039	LLGCITISLTGRDNQVEGE
#46	gHCU-1069	FLATCUNGAETUFGAGSK
#47	gHCU-1078	WVYTGAGNCLAGPKGPIT
#48	gHCU-1088	TLAGPKGPITQFTYDLDL
#49	gHCU-1098	QHTYFVLDLUGGQAPFGR
#50	gHCU-1108	VGGQAPFGSRPLTPCTCGSS
#51	gHCU-1118	PLTPCTCGSSDLVUTRHD
#52	gHCU-1128	DLVUTRHDVUPGRGDS
#53	gHCU-1138	VIPURRGDSRCGLCPFPV
#54	gHCU-1148	RCGLCPFPVSYLKGSSGCP
#55	gHCU-1158	SYLKGSSGGLCPGSHAVG
#56	gHCU-1168	LLCPGSHAVGITRAAUCTRG
#57	gHCU-1178	ITRAAUCTRGAAKADITPV
#58	gHCU-1188	UAKAUDITPESHTTHRSP
#59	gHCU-1198	ESHTTHRSPFTDSTTPPA

【도 20d】

헬리카제 펩타이드 풀의 아미노산 서열

NS3 helicase (1208-1556)					
No	Name	Sequence	No	Name	Sequence
#50	HCUI208-1227	VITDSTTPPA UPQTIQVAHL	#77	HCUI458-1477	IGTUDFSLDP TITIDTTTUP
#51	HCUI218-1237	UPQTIQVAHL HAPTCSGKST	#78	HCUI468-1487	TITIDTTTUP QDAVRSQRR
#52	HCUI228-1247	HAPTCSGKST KUPAAYAAQG	#79	HCUI478-1497	QDAVRSQRR CRTGGRGFI
#53	HCUI238-1257	KUPAAYAAQG YKULVLEPSV	#80	HCUI488-1507	CRGGRGRCI YRFUTPGERP
#54	HCUI248-1267	YKULVLEPSV AATLGFGVXH	#81	HCUI498-1517	YRFUTPGERP SGHDSLSULC
#55	HCUI258-1277	AATLGFGVXH SKAKGIDPNI	#82	HCUI508-1527	ECYDAGCAGY ELTPAETSUR
#56	HCUI268-1287	SKAKGIDPNI RTGURAITTC	#83	HCUI518-1547	ELTPAETSUR LRAVLTNPGL
#57	HCUI278-1297	RTGURAITTC APITVSTYCK	#84	HCUI528-1557	LRAVLTNPGL PUCQDHELFU
#58	HCUI288-1307	HSTDSISILG ICTULDQAEY	#85	HCUI538-1567	PUCQDHELFU ESUTTGLETHI
#59	HCUI298-1317	ICTULDQAEY AGARLUVLAT	#86	HCUI548-1577	ESUTTGLETHI DAHFLSQTRQ
#60	HCUI308-1327	ATPPGCSUTUP HPNIEEVALS	#87	HCUI558-1587	DAHFLSQTRQ AGDNIPYLVA
#61	HCUI318-1337	HPNIEEVALS HTGEIPFYCK	#88	HCUI568-1597	AGDNIPYLVA YQATUCARAQ
#62	HCUI328-1347	HTGEIPFYCK AIPIEVIKCC	#89	HCUI578-1607	YQATUCARAQ APPPSWDQHW
#63	HCUI338-1357	APPPSWDQHW KCLTRLKPTL	#90	HCUI588-1617	APPPSWDQHW KCLTRLKPTL
#64	HCUI348-1367	KCLTRLKPTL RGPTPLLYRL	#91	HCUI598-1627	KCLTRLKPTL RGPTPLLYRL
#65	HCUI358-1377	RGPTPLLYRL GAUQHEVTLY	#92	HCUI608-1637	RGPTPLLYRL GAUQHEVTLY
#66	HCUI368-1387	GAUQHEVTLY HPVITKTHAC	#93	HCUI618-1647	GAUQHEVTLY HPVITKTHAC

【도 20e】

NS5A 펩타이드 풀의 아미노산 서열

NS5A (1972-2411)					
No	Name	Sequence	No	Name	Sequence
#94	gHCV-1972	SGSELRDVWDGICTULTDFK	#113	gHCV-2192	GSPPSLASSASQLSAPSLR
#95	gHCV-1982	WICTVLTDFKTLQSKLLFR	#114	gHCV-2202	ASQLSAPSLKATCTIHEDSP
#96	gHCV-1992	TELQSKLLPRLPGUPITSCQ	#115	gHCV-2212	ATCTIHEDSPDNLKAMLL
#97	gHCV-2002	LPGUPFFSCQGYKGVGRGE	#116	gHCV-2222	DADLIEALLERQEMGCHIT
#98	gHCV-2012	RGYKGVGRGEGHQTTCPCG	#117	gHCV-2232	WRQEMGCHITAVESEKVVLI
#99	gHCV-2022	CHQTTCPCGAQIACHURNG	#118	gHCV-2242	RAVESEKVVILDSIEPIRAE
#100	gHCV-2042	SHRIUGPPTCSNTWSTIP1	#119	gHCV-2252	LDSIEPIRAEDERENUSUPA
#101	gHCV-2052	SUTWGTIPINAYITGFCSP	#120	gHCV-2262	EDEREVSUPAEILRSRKIP
#102	gHCV-2062	NAYITGFCSPSPAPHSRAL	#121	gHCV-2272	EILRSRKIPAMHFWARPD
#103	gHCV-2072	SPAPHSRALGRUAAETPUE	#122	gHCV-2282	YEPFLLESTURDPDYVPPVUH
#104	gHCV-2082	GRUAAETPUEUTRUGDFHYU	#123	gHCV-2302	DPDYVPPVUHGCPLPPTKAA
#105	gHCV-2092	UTRUGDFHYUTGUTDMVHC	#124	gHCV-2322	PDPPTKATKULTSTSTUS3
#106	gHCV-2102	TGUTDMVHCPCQVAPPEFT	#125	gHCV-2342	ULTSTSTUS3ALAEATKTF
#107	gHCV-2122	TELDGURLHRYAPACKPLLR	#126	gHCV-2362	ALAEATKTFGCGSWAADS
#108	gHCV-2132	YAPACKPLLRDEUSFQUCLN	#127	gHCV-2382	CGCGSWAADSQTATAPPDQT
#109	gHCV-2152	QVLUGSQLPCEPEPDVAMLT	#128	gHCV-2402	NDGDKEEDVESYSSHPPLLE
#110	gHCV-2162	EPEPDVAMLTSLTDPSSHIT	#129	gHCV-2422	ZSYSSHPPLLEGCPGDPDLSD
#111	gHCV-2172	SLTDPSSHITAEAKRLAR	#130	gHCV-2442	GCPGDPDLSDGVSUSTUSEEA
#112	gHCV-2182	AEAKRLARGSPPSLASSS			

【서열목록】

<110> Genexine Co., Ltd. Pohang University of Science & Technology
Dong a Pharmaceutical Co., Ltd. Daewoong Pharm. CO., LTD. POSCO <
120> A vaccine enhancing the protective immunity to Hepatitis C virus
using plasmid DNA and recombinant adenovirus <130> 2p-05-18 <160> 54 <170>
KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 41 <212> DNA <213> Artificial Sequence
<220> <223> PCR primer for HCV gene <400> 1 aaactgcagg tgcggttaac gggaggtctc
gtagaccgtg c 41 <210> 2 <211> 30 <212> DNA <213>
Artificial Sequence <220> <223> PCR primer for HCV gene <400> 2 ccctctagat
gcgtccgccca ggagaaggaa 30 <210> 3 <211>

30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer for pTV2 ST <400> 3 aaatctagaa ccatgggccc caggttgggt

30 <210> 4 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer for pTZ HCV <400> 4 cgagatctag caccgcgtg acaggagga

29 <210> 5 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer for pTZ HCV <400> 5 gcgaattcta atactccac ctgatcgca

29 <210> 6 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer for pTV2 ST <400> 6 aaggcgcgcc tgagcacaaa tcctaaacct caa

33 <210> 7 <211> 34 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer for pTV2 ST <400> 7 cccctctaga ttatgcgtcc gccaggagaa ggaa

34 <210> 8 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer for pTV2 ST <400> 8 aaggcgcgcc gcacccgctg gacaggagga

30 <210> 9 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer for pTZ HCV <400> 9 aaggcgcgcc gcccaggtt gggtgtgcgc

30 <210> 10 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer for pTZ HCV <400> 10 aaatctagat cagtctcgca ggcccgcgtg ggc

33 <210> 11 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer for pTV2 gDsST <400> 11 acttgagtga caatgacatc c

21 <210> 12 <211> 35 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223> PCR primer <400> 12 aaaaatctag attaatactg ggacttgatc actat

35 <210> 13 <211> 34 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer <400> 13 tcgcgacccg ggcgacggcc agtgaattgt accg

34 <210> 14 <211> 36 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer <400> 14 tcgcgaggcg cgccacgagc cgccgcgcct ggaagg

36 <210> 15 <211> 34 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer <400> 15 aatattgtcg acttcagaag aactcgtcaa gaag

34 <210> 16 <211> 34 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer <400> 16 aatattgggc ccgaacatgt gagcaaaagg ccag

34 <210> 17 <211> 36 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer <400> 17 cccctgcaga ccatgcccat cacggcctac tcccaa

36 <210> 18 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer <400> 18 aaatctagat tagcatggcg tggagcagtc ctc

33 <210> 19 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer <400> 19 aaaggtacca tgtccggctc gtggctaagg gat

33 <210> 20 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer <400> 20 aatctagaag cggttgggga gcaggtagac

30 <210> 21 <211> 25 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer <400> 21 cccgggaaag tcctgccgcg cctcg

25 <210> 22 <211> 17 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer <400> 22 acaacggttt ggaggga

17 <210> 23 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer <400> 23 gtctagagca agatgtgtca ccagcagttg gtc

33 <210> 24 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 PCR primer <400> 24 ctggatccga acctaactgc agggcacaga tgc

25 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 PCR primer <400> 25 aagatatcga attccccctc

26 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 PCR primer <400> 26 ttgccatggc catatttatc a

27 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 PCR primer <400> 27 gtaatacgac tcactatagg gc

28 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 PCR primer <400> 28 tatgagctct acaccagcag c

29 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 PCR primer <400> 29 aattaaccct cactaaaggg

30 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 PCR primer <400> 30 ggtgtagagc tcatacttga g

31 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 PCR primer <400> 31 aactcgaggt cgacggtatc

32 <211> 19 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 PCR primer <400> 32 ttctcgagcg gccgcacct

33 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 PCR primer <400> 33 gaagatctat gccaggttgg gtgtgcgcgc

34 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer <400> 34 aaatctagat cagtactccc acttaatggc cca

33 <210> 35 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer <400> 35 tatgagctct acagcaccag c

21 <210> 36 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer <400> 36 gctgtagagc tcatatTTTT actg

24 <210> 37 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer for HCV-R <400> 37 cccgggaggg ggggtcctgg ag

22 <210> 38 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer for HCV-F <400> 38 ccatggcggtt agtatgagtg tcgtgcagc

29 <210> 39 <211> 36 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

Probe <400> 39 ccgagcctta gtatgagtgt cgtgcagcct gtcgg

36 <210> 40 <211> 18 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer for gDs <400> 40 ggcatggggg gggctgcc

18 <210> 41 <211> 27 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer for gDs <400> 41 cgagatctga gagaggcatc cgccaag

27 <210> 42 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer for HCV gene <400> 42 cccaagctta tgagcacaaa tcctaaacct

30 <210> 43 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer for HCV gene <400> 43 gctctagacg gggagttgcc acccctgccc

30 <210> 44 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer for pTV2 gDsE2t <400> 44 aaggcgcgcc cgatgtacgg gccagatata

30 <210> 45 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer for pTV2 gDsE2t <400> 45 aaggcgcgcc agagaggcat ccgccaaggc

30 <210> 46 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer for pTZ HCV <400> 46 aaactgcaga ccatgggccc caggttgggt

30 <210> 47 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer for pTZ HCV <400> 47 aaatctagat cagtctcgca ggcccgctg ggc

33 <210> 48 <211> 30 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer for pTZ HCV <400> 48 aaggcgcgcc ctcccatcac ggcctactcc

30 <210> 49 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

PCR primer for pTZ HCV <400> 49 aaatctagat tagcatggcg tggagcagtc ctc

33 <210> 50 <211> 2178 <212> DNA <213> Hepatitis C virus and Herpes

Simplex Virus (gDsDST) <400> 50 atgggggggg ctgccgccag gttgggggcc gtgattttgt

ttgtcgtcat agtgggcctc 60 catgggggtcc gcggcaaata tgccttggcg gatgcctctc

tggcgcgccg ccccaggttg 120 ggtgtgcgcg cgactaggaa gacttccgag cggtcgcaac

ctcgtggaag gcgacagcct 180 atccccaagg ctgcccaacc cgagggtagg acctgggctc

agcccgggta cccttggccc 240 ctctatggca atgagggtct gggatgggca ggatggctcc

tgtcaccccg cggtctcgg 300 cctagttagg gccccacaga ccccggcgt aggtcgcgta

atttgggttaa ggtcatcgat 360 actctcacat gcggcttcgc cgacctcatg gggtacattc

cgctcgtcgg cgcccccta 420 gggggcggtg ccagggcctt ggcacatggt gtccggcttc

tggaggacgg cgtgaactat 480 gcaacaggga atctgcctgg ttgctctttc tctatcttcc

ttttggctct gttgtctggt 540 ttgaccaccc cagtttctgc ttacgaggtg cgcaacgtgt

ccggggtata ccatgtcacg
acatgatctt gcatacccc
gttgggtagc gctcactccc
tacgacgaca cgtcgacttg
gggatctgtg cggatctgtc
atgagacgac acaggactgc
tggcctggga tatgatgatg
tccggatccc acaagctgtc
gccttgccta ctattccatg
ttgccggcgt cgatgggagc
ggttcgtgag catctttgcg
gcagttggca catcaacagg
ttgccgact gttctacaca
gttgccgccc cattgacaag
gcggttcgga ccagaggcct
ccgcatcgca ggtgtgtggt
ctaccgatcg ttccggtgcc
tcctcaacaa cacgcggccg
ctgggttcac caagacgtgc
ccttgacctg cccacaggat
gttcgggacc ttggttaaca

600 aacgactgct ccaactcaag catcgatat gaggcagcgg
660 ggggtcgtgc cctgcgttcg ggagggtaac tcctcccgtt
720 acgctcgcgg ccaggaatgc cagcgttccc actacgacaa
780 ctcgttgggg cggctgcttt ctgctccgct atgtacgtgg
840 ttctcgtct cccagctgtt caccttctca cctcgccggc
900 aattgctcac actatcccgg ccacgtatca ggtcaccgca
960 aattggtcgc ccacagcagc cctgggtggtg tcacagatgc
1020 gtggacatgg tggcgggggc ccactgggga gtcctggcgg
1080 gtggccaact gggctaaggt tttggttggt ctgctgcttt
1140 acccgctga caggaggaac ggaaggccgc acgaccaacc
1200 tccggaccat ctcaaaaaat ccagcttgta aacaacaacg
1260 actgctctga actgcaatga ctccctcagc tctgggttta
1320 cacaagttcg actcgtccgg atgccagag cgtatggcca
1380 ttcgctcagg gatggggctc catcacgtat gctgagtctg
1440 tactgttggc actacgcacc ccgacagtgt ggtatcgta
1500 ccagtatatt gttcacccc aagcccagtt gtagtgggga
1560 cctacgtaca cctgggggga gaatgagacg gacgtgctgc
1620 ccgcaagcga actggttcgg ctgtacatgg atgaatagca
1680 gggggccccc cgtgtgacat cgggggggta ggcaacaaca
1740 tgcttccgga agcaccgccga agccatttac accaaatgtg
1800 cctaggtgta tggttgacta ccatacaga ctttggcact

accctgcac tatcaacttt	1860 accatcttca aggtcaggat gtatgtgggg ggcgtggagc
acaggctcga tgctgcgtgc	1920 aattggactc ggggagagcg gtgtgacttg gaagacaggg
atagatcaga gctcagcccg	1980 ctgctactgt ctacaacaga gtggcaggta ttgccctgtt
ccttcaccac cctaccggcc	2040 ctgtccactg gattgattca cctccaccag aacatcgtgc
acgcgcaaca cctgcacggt	2100 gtggggtcag cggttgtctc catagtgatc aagtgggagt
atgtccigtgt gctcttcctt	2160 ctccctggcgg acgcataa

2178 <210> 51 <211> 2841 <212> DNA <213> Hepatitis C virus (NS34) <400>

51 atggctccca tcacggccta ctcccaacag acgcggggcc tacttgggtg catcatcact	60
agcctcacag gccgggacaa gaaccaagtc gagggggagg ttcaagtggg tgccaccgca	120
acacaatctt tcctggcgac ctgcgtcaat ggcgcttggg ctgtcttcca tggcgccggc	180
tcaaagaccc tagccggccc aaaggggcca attacccaaa tgtacaccaa tgtagacctg	240
gacctcgtcg gctggcaggc acccccggg tcgcgtcccc tgacaccatg cacctgcggc	300
agctcagacc ttacttggg cagcagacat gctgatgtca ttccgggtgcg ccggcggggc	360
gacagtaggg ggagcctacc ctgtcccaga ccagtctcct acttgaaggg ctccctcggg	420
gtccactgc tctgcccttc ggggcacgct gttggcatct ttccgggtgc tgtatgcacc	480
cgggggggtg cgaaggcggg ggacttcata cccgttgaat ctatggaaac tactatgcgg	540
tctccgtct tcacagataa ctcaaccccc ccggccgtac cgcagacatt ccaagtggcc	600
catctacacg cccccactgg cagtggtaag agcactaaag tgccgggtgc gtatgcagcc	660
caagggtaca aggtgcttgt cctgaacccg tccgttgccg ccaccttggg ttttgggggtg	720
tatatgtcta aagcacatgg tatcgacccc aacatcagaa ctgggggttag ggccatcacc	780
acgggcgccc ctattacata ctctacctat ggcaagtctt ttgccgatgg tggttgctcc	840

gggggcgcct acgacatcat aatatgtgat gagtgccact caactgactc aacttccatc	900
ttgggcattg gcacagtcct ggaccaagcg gagacggctg gagcgcggtc cgtcgtgctc	960
gccaccgcta cgcctccggg atcggtcacc gtgccacacc ccaatatcga ggaggtggct	1020
ctgtccaaca ctggagagat ccccttctac ggcaaagcca tccccattga ggtcatcaag	1080
gggggaagac atctcatttt ctgccattcc aagaagaagt ctgacgagct cgccgcaaag	1140
ctgtcagccc tcggacttaa tgctgtagca tattaccggg gtcttgatgt gtccgtcata	1200
ccgaccagcg gagacgtcgt tgctgtggcg acagacgtc taatgacggg ctataccggc	1260
gattttgact cagtgattga ctgtaacaca tgtgtcacc agacagtcga ttttagcttg	1320
gateccacct tcaccattga cagcagcacc gtgccccaa acgcagtgct gcgctcacag	1380
cggcggggca ggactggcag gggcaggaga ggcatctaca ggtttgtgac tccaggagaa	1440
cggccttcgg gcatgttcga ttcttccgtc ctgtgtgagt gctatgacgc gggctgtgct	1500
tggtatgagc tcacgcctgc tgagacttca gttagggtgc gggcttacct gaatacacca	1560
gggttgcccg tctgccagga ccatctggag ttttgggaga gcgtcttcac aggccctacc	1620
cacatagatg cccacttcct atcccagact aagcaggcag gagacaactt cccctatctg	1680
gtagcatacc aagccacagt gtgcgccaga gctcaagctc cgcctccatc atgggatcaa	1740
atgtggaagt gtctcacgcg gctcaaact acgctgcacg ggccaacacc cctgctgtat	1800
aggctaggag ccgtccaaaa tgaggtcacc ctcacacacc ccgtgaccaa attcatcatg	1860
gcatgcatgt cggctgacct ggaggtcgtc actagcactt gggtgctagt aggcggggtc	1920
cttgacgtc tggccgcgta ctgcttgaca acaggcagcg tggtcattgt gggcaggatc	1980
atcttgtccg ggaggccagc cgtcattccc gacaggaag tcctctaccg ggagttcgat	2040
gaaatggaag agtgcgttc acacctccct tacatcgaac aggggatgct gctcgccgag	2100

caaacaagc agaaggcgct cgggttgctg caaatggcca ccaaacaagc ggaggctgct 2160
 gacccgtgg tggagactaa gtggcaagcc cttgaggtct tctgggcaaa gcacatgtgg 2220
 atca gcgggataca gtacttgga ggcttatcca ctctgcccgga gaaccccgcg 2280
 atcac tgatggcatt cacatcctct atcaccagcc cgctcaccac ccaaagtacc 2340
 attta acatcctggg ggggtgggtg gctgcccgag ttgccccccc cagcgctgct 2400
 atttg tgggcgctgg catcgccggt gcggccgttg gcagcatagg ccttggaag 2460
 atttggtgg acatcctggc aggctatgga gcaggggtgg ccggcgcaact cgtggccttt 2520
 aaggatcatga gtggcgaggt gccctccacc gaggatctgg ttaatttact tctgccatc 2580
 ctgctcctg gcgccctggt cgtcgggggt gtgtgcgcag caatactgcg ccgacacgtg 2640
 ggtccaggag agggggctgt gcagtggatg aaccggctga tagcgctcgc ctgcgggggt 2700
 aaccacgtct gggggacgca ctatgtgcct gagagcgacg cagcacaacg tgttactcag 2760
 atcctctcca gccttaccat gactcagttg ctaaagaggc ttcaccagtg gattaatgag 2820
 gactgctcca cgccatgcta a 2841 <210>

52 <211> 3123 <212> DNA <213> Hepatitis C virus (NS5) <400> 52 atgtccgg

cgtggctaag ggatgtctgg gactggatat gcacggtgct gacagacttc 60 aagacctggc
 tccagtccaa gcttctgccg cggttaccgg gcgtcccttt cttctcgtgc 120 caacgcgggt
 acaagggagt ctggcggggg gaaggcatca tgcaaaccac ctgcccattg 180 ggagcacaga
 tcgccggaca tgtcaaaaac ggttccatga ggatcgtcgg gcctagaacc 240 tgcagcaaca
 cgtggcatgg aacatttccc atcaacgcat acaccacggg cccttgctcg 300 ccctccccgg
 cgccaaatta ttccagggcg ctgtggcggg tggccgctga ggagtacgtg 360 gaggttacgc
 ggggtggggga ttccactac gtgacggggc tgaccactga caacgtgaaa 420 tgcccatgcc

aggttccggc cctgaattc ttcacagaat tggatggggt gcggttgac	480 aggtacgctc
cggcgtgcaa gcctctccta cgggatgagg tctcattcca ggtcgggctc	540 aaccaatacc
tggttggatc gcagctccca tgcgagcccg aaccggatgt agcagtgtc	600 acttccatgc
tcaccgaccc ctcccacatt acagcagaga cggctaagcg taggctggcc	660 agagggtctc
ccccctcctt ggccagctct tcagctagcc agttgtctgc gccttccttg	720 aaggcgacat
gcaccatcca tcatgactcc ccggacgccg acctcattga ggccaacctc	780 ctgtggcggc
aggagatggg cgggaacatc acccgtgtgg agtcagagaa taaggtagtg	840 atactggact
ctttcgaacc gattcgagcg gaggaggatg agagggaagt atccgttcg	900 gcggagatcc
tgcggagatc taggaagttc cccgcagcga tgcccatatg ggcacgccc	960 gattacaatc
ctccccctgt agagtcctgg aaggatccgg actacgttcc tccggtagta	1020 cacggatgcc
cattgccacc taccaaggcc gtcgcgatac cccccacg gaggaagagg	1080 acgattgtcc
tgacagagtc cactgtgtct tctgccttgg cggagctcgc tactaagacc	1140 ttcggcggct
ccggatcgtg ggccgccgac agcggcacgg cgactgcccc tcctgaccag	1200 acctccgacg
acggcgacaa agaatctgac gttgagtcgt actcctccat gccccctt	1260 gagggagagc
cgggggaccc cgatctcagc gacgggtctt ggtccaccgt gagcgaggaa	1320 gccagtgagg
acgtcgtctg ctgctcgatg tcctacacat ggacgggcgc cctgatcacg	1380 ccatgcgctg
cggaggaaaag caagctgccc atcaaccgt tgagcaactc ctigtctcgt	1440 caccacaata
tgggtgtacgc cacaacatcc gcgagcgcaa gtctgcggca gaagaaggtc	1500 acctttgaca
gactgcaagt cctggacgat cactaccggg acgtgctcaa ggagatgaag	1560 gcgaaggcgt
ccacagttaa ggccaaactt ctatctgtag aggaagcctg caagctgacg	1620 cccccacatt
cggccaaatc aaaatttggc tatggggcga aggacgtccg gaggcctatcc	1680 agcagggccc

tcaaccacat cacctccgtg tggaaggact tgctggaaga cactaagaca	1740 ccaattgaca
ccaccatcat ggcaaaaaat gaggttttct gcgtccaacc agagaaagga	1800 ggccgcaagc
cagctcgcct tatcgtattt ccagacctgg gagttcgtgt atgcgagaag	1860 atggccctct
acgacgtggt atccaccctc cctcaggccg tgatgggctc ctcatacggg	1920 ttccagtatt
ctcctgggca gcgggtcgag ttcctggtga aaacctggaa atcgaagaaa	1980 tgcccatg
gctttcata tgacaccgc tgctttgact caacggtcac tgagaatgac	2040 atccgtattg
aggagtcat ttaccaatgt tgtgacttgg ccccggaagc caggcaggtc	2100 ataaggtcgc
tcacagaacg gctttatata ggggttcct tgactaatc aaaagggcag	2160 aactgcggtt
atcgccggtg ccgcgcaagc ggcgtgctga cgactagctg cggcaatact	2220 ctcacatgtt
acttgaaggc ctctgtgcc tgtcgagctg cgaagctcca ggactgcacg	2280 atgctcgtga
acggagacga ccttgtcgtt atctgtgaga gcgcgggaac ccgagaggat	2340 gcggcgagcc
tacgagtctt cacggaggct atgactaggt actctgcccc ccccggggac	2400 ccgcctcaac
cggaatatga ctgggagttg ataacatcat gttcctccaa tgtgtcggtc	2460 gcgcacgatg
catccggcaa aagggtgtac tacctcacc gtgacccac cccccctt	2520 gcgcgggctg
cgtgggagac agctagacac actccagtta actcctggct gggcaacatc	2580 atcatgtatg
cgccacctt ctgggcaagg atgattctga tgactcactt cttctccatc	2640 cttctagccc
aggagcaact tgaaaaggcc ctgattgtc agatctacgg ggcctgttac	2700 tccattgagc
cacttgacct acctcagatc attgagcgac tccatggtct tagcgcatit	2760 tcaactcata
gttactctcc aggtgagatc aatagggtgg ctcatgcct caggaaactt	2820 ggggttcac
ccttgcgagt ctggagacat cgggccagaa gtgtccgcgc taagctgctg	2880 tcccaggggg
ggagggccgc cacatgtggc aagtacctt tcaactgggc agtaaggacc	2940 aagcttaagc

tcactccaat cccagctgcg tcccagttgg acttgtccag ctggttcgtt 3000 gctggttaca
 gtgggggaga catatatcac agcctgtctc gtgcccagacc cgcctggttc 3060 atgttatgcc
 tactcctact ttctgtaggg gtaggcgtct acctgtctcc caaccgcttc 3120 tag
 3123 <210> 53 <211> 2390 <212> DNA <213> Homo sapiens (hIL-12m) <400>
 53 atgtggcccc ctgggtcagc ctcccagcca cgcacctcac ctgccgcggc cacaggtctg 60
 catccagcgg ctgcacctgt gtccctgcag tgccgggtca gcatgtgtcc agcgcgcagc 120
 ctctccttg tggctacctt ggtcctcctg gaccacctca gtttggccag aaacctcccc 180
 gtggccactc cagacctcagg aatgttccca tgccttcacc actcccaaaa cctgctgagg 240
 gccgtcagca acatgtctca gaaggccaga caaactctag aattttaccc ttgcacttct 300
 gaagagattg atcatgaaga tatcacaaaa gataaaacca gcacagtgga ggcctgttta 360
 ccattggaat taaccaagaa tgagagtgc ctaaattcca gagagacctc ttccataact 420
 aatgggagtt gcctggcctc cagaaagacc tcttttatga tggccctgtg ccttagtagt 480
 atttatgaag acttgaagat gtaccaggtg gatttcaaga ccatgaatgc aaagcttctg 540
 atggatccta agaggcagat ctttctagat caaaacatgc tggcagttat tgatgagctg 600
 atgcaggccc tgaatttcaa cagtgcagact gtgccacaaa aatcctccct tgaagaaccg 660
 gatTTTTata aaactaaaat caagctctgc atacttcttc atgctttcag aattcgggca 720
 gtgactattg atagagtgat gagctatctg aatgcttcct aaaaagagag gtccctccaa 780
 accgttgttg gggatccact agttctagag cggccatcga attccccctc tccctcccc 840
 cccctaacgt tactggccga agccgcttgg aataaggccg gtgtgcgttt gtctatatgt 900
 tattttccac catattgccg tcttttggca atgtgagggc ccggaaacct ggccctgtct 960
 tcttgacgag cattcctagg ggtctttccc ctctcgccaa aggaatgcaa ggtctgttga 1020

atgtcgtgaa ggaagcagtt cctctggaag cttcttgaag acaaacaacg tctgtagcga	1080
ccctttgcag gcagcggaac cccccacctg gcgacaggtg cctctgcggc caaaagccac	1140
gtgtataaga tacacctgca aaggcggcac aaccccagtg ccacgttgtg agttggatag	1200
ttgtggaaag agtcaaattg ctctcctcaa gcgtattcaa caaggggctg aaggatgccc	1260
agaaggtacc ccattgtatg ggatctgata tggggcctcg gtgcacatgc ttacatgtg	1320
tttagtcgag gttaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac ggggacgtgg ttttcctttg	1380
aaaaacacga tgataatatg gccatgggtc accagcagtt ggtcatctct tggttttccc	1440
tggtttttct ggcatctccc ctctgtggcca tatgggaact gaagaaagat gtttatgtcg	1500
tagaattgga ttggtatccg gatgcccctg gagaaatggt ggtcctcacc tgtgacaccc	1560
ctgaagaaga tgggtatcacc tggaccttgg accagagcag tgaggctcta ggctctggca	1620
aaaccctgac catccaagtc aaagagtttg gagatgctgg ccagtacacc tgtcacaag	1680
gaggcgaggt tctaagccat tcgctcctgc tgcttcacaa aaaggaagat ggaatttggt	1740
ccactgatat tttaaaggac cagaaagaac caaaaataa gacctttcta agatgcgagg	1800
ccaagaatta ttctggacgt ttcacctgct ggtggctgac gacaatcagt actgatttga	1860
cattcagttg caaaagcagc agaggctctt ctgaccccca aggggtgacg tgcggagctg	1920
ctacactctc tgcagagaga gtcagagggg acaacaagga gtatgagtac tcagtggagt	1980
gccaggagga cagtgcctgc ccagctgctg aggagagtct gccattgag gtcattggtg	2040
atgccgttca caagctcaag tatgagctct acaccagcag cttcttcata agggacatca	2100
tcaaacctga cccacccaag aacttgcagc tgaagccatt aaagaattct cggcaggtgg	2160
aggtcagctg ggagtaccct gacacctgga gtactccaca ttctacttc tccctgacat	2220
tctgcgttca ggtccagggc aagagcaaga gagaaaagaa agatagagtc ttacaggaca	2280

```

agacctcagc cacggtcatc tgccgcaaaa atgccagcat tagcgtgcgg gccaggacc      2340
gctactatag ctcatcttgg agcgaatggg catctgtgcc ctgcagttag      2390 <210>
54 <211>      2946 <212>      DNA <213>      Hepatitis C virus and Herpes simplex virus
(gDsNS34) <400>      54 atgggggggg ctgccgccag gttggggggc gtgatittgt ttgtcgtcat
agtgggcctc      60 catgggggtcc gcggcaaata tgccttggcg gatgcctctc tggcgcgccc
tcccatcagc      120 gcctactccc aacagacgcg gggcctactt ggttgcacat tactagcct
cacaggccgg      180 gacaagaacc aagtcgaggg ggaggttcaa gtggttgcca ccgcaacaca
atctttcctg      240 gcgacctgcg tcaatggcgc ttggactgtc ttccatggtg ccggctcaaa
gaccctagcc      300 ggcccaaagg ggccaattac ccaaatgtac accaatgtag acctggacct
cgtcggctgg      360 caggcacccc ccgggtcgcg tcccctgaca ccatgcacct gcggcagctc
agacctttac      420 ttggtcacga gacatgctga tgtcattccg gtgcgccggc ggggcgacag
taggggggagc      480 ctaccctgtc ccagaccagt ctccctactt aagggtcctt cgggtgggtcc
actgctctgc      540 ccttcggggc acgtgttgg catctttcgg gctgctgtat gcaccggggg
ggttgcaag      600 gcggtggact tcatacccg tgaatctatg gaaactacta tgcggtctcc
ggtcttcaca      660 gataactcaa ccccccggc cgtaccgcag acattccaag tggcccatct
acacgcccc      720 actggcagtg gtaagagcac taaagtgccg gctgcgtatg cagcccaagg
gtacaaggtg      780 cttgtcctga acccgctccg tgccgccacc ttgggttttg ggggtgtatat
gtctaaagca      840 catggtatcg accccaacat cagaactggg gttagggcca tcaccacggg
cgcccctatt      900 acatactcta cctatggcaa gtttcttgcc gatggtggtt gctccggggg
cgcttacgac      960 atcataatat gtgatgagtg cactcaact gactcaactt ccatcttggg
cattggcaca     1020 gtcctggacc aagcggagac ggctggagcg cggctcgtcg tgctcgccac

```

gataaat	1080 ccgggatcgg tcaccgtgcc acacccaat atcgaggagg tggctctgtc
caaca: gga	1140 gagatcccct tctacggcaa agccatcccc attgaggtca tcaagggggg
	1200 attttctgcc attccaagaa gaagtctgac gagctcgccg caaagctgtc
	1260 cttaatgctg tagcatatta ccggggctctt gatgtgtccg tcataccgac
	1320 gtcgttgtcg tggcgacaga cgctctaag acgggctata ccggcgattt
gig	1380 attgactgta acacatgtgt caccagaca gtcgatttta gcttggatcc
acccaccc	1440 attgacacga cgaccgtgcc ccaagacgca gtgtcgcgct cacagcggcg
gggcaggact	1500 ggcaggggca ggagaggcat ctacaggttt gtgactccag gagaacggcc
ttcgggcatg	1560 ttcgattctt ccgtcctgtg tgagtgtat gacgcgggct gtgcttggtg
tgagctcacg	1620 cctgctgaga cttcagttag gttgcgggct tacctgaata caccagggtt
gcccgtctgc	1680 caggaccatc tggagttttg ggagagcgtc ttcacaggcc tcaccacat
agatgcccac	1740 ttcctatccc agactaagca ggcaggagac aacttcccct atctggtagc
ataccaagcc	1800 acagtgtgcg ccagagctca agctccgcct ccatcatggg atcaaagtgt
gaagtgtctc	1860 acgcgggtca aacctacgt gcacgggcca acaccctgc tgtataggct
aggagccgtc	1920 caaatgagg tcaccctcac acaccctg accaaattca tcatggcatg
catgtcggct	1980 gacctggagg tcgtcactag cacttgggtg ctagtaggcg gggtccttgc
agctctggcc	2040 gcgtactgct tgacaacagg cagcgtggtc attgtgggca ggatcatctt
gtccgggagg	2100 ccagccgtca ttcccgacag ggaagtcctc taccgggagt tcgatgaaat
ggaagagtgc	2160 gcttcacacc tcccttacat cgaacagggg atgtgtctcg ccgagcaatt
caagcagaag	2220 gcgctcgggt tgctgcaa at ggccacaaa caagcggagg ctgctgtccc
cggtgtggag	2280 actaagtggc aagcccttga ggtcttctgg gcaaagcaca tgttgaactt

catcagcggg	2340 atacagtact tggcaggctt atccactctg cccgggaacc ccgcgatagc
atcactgatg	2400 gcattcacat cctctatcac cagcccgtc accacccaaa gtaccctcct
gtttaacatc	2460 ctgggggggt ggggtgctgc ccagcttgc cccccagcg ctgcttcggc
ttttgtgggc	2520 gctggcatcg ccggtgcggc cgttggcagc ataggccttg ggaaggtgct
tgtggacatc	2580 ctggcaggct atggagcagg ggtggccggc gcactcgttg cctttaaggt
catgagtggc	2640 gaggtgccct ccaccgagga tctggttaat ttacttcctg ccatcctgtc
tcctggcgcc	2700 ctggtcgtcg gggttgtgtg cgcagcaata ctgcgccgac acgtgggtcc
aggagagggg	2760 gctgtgcagt ggatgaaccg gctgatagcg ttgcctcgc ggggtaacca
cgtctggggg	2820 acgcactatg tgcctgagag cgacgcagca caacgtgtta ctcagatcct
ctccagcctt	2880 accatgactc agttgctaaa gaggcttcac cagtggatta atgaggactg
ctccacgcca	2940 tgctaa

2946

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.